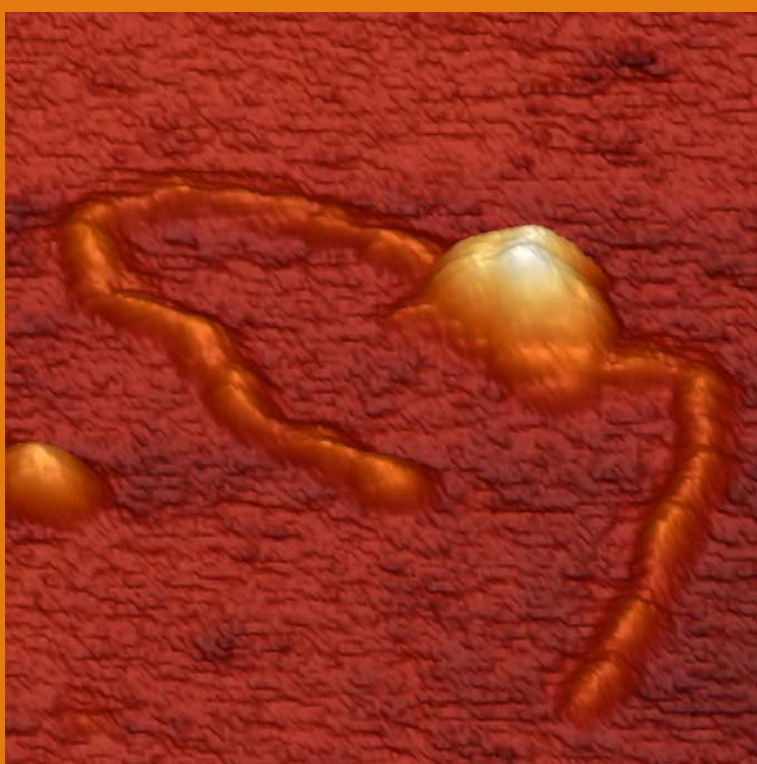


*Caracterización mediante
Microscopía de Fuerzas Atómicas
de complejos de regulación transcripcional*



Tesis doctoral
Paloma Gutiérrez del Arroyo

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

*Caracterización mediante Microscopía de Fuerzas Atómicas
de complejos de regulación transcripcional.*

Memoria presentada por **Paloma Gutiérrez del Arroyo**
para optar al grado de Doctora en Biología Molecular.

El presente trabajo de tesis ha sido desarrollado en el Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección del Profesor **José López Carrascosa** (CNB, CSIC), el Profesor **José María Valpuesta** (CNB, CSIC) y la Investigadora **Marisela Vélez** (ICP, CSIC).

Madrid, julio 2009

A Luisa y a Fernando
Con admiración, agradecimiento y amor eternos.

Y al resto de personas que contagian su pasión por el Saber

Musicalis sciencia/Science laudabili

Triplum. Musicalis sciencia
qua regitur melodia
universis rectoribus
arte suaque practicis (...)

Duplum. Science laudabili,
musice venerabili,
rethorica sciencia
cum omni reverencia
salutem, O dulcissima
subiectisque gratissima (...)

Motete Anónimo (s. XIV).
París: Bibliothèque Nationale,
Coll. de Picardie 67, fol. 67v.

*Et Musique est une Science
Qui veut qu'on rie et chante et dance.
Cure n'a de merencolie (...)
Partout ou elle est joie y porte;
Les desconfortez reconforte,
Et nes seulement de l'oir
Fait elle les gens resjoir.*

Guillaume de Machaut (~1300–1377)

Agradecimientos

Agradezco al Centro Superior de Investigaciones Científicas el haberme concedido una beca I3P para realizar la tesis doctoral, y al Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) y al Instituto Nicolás Cabrera (Universidad Autónoma de Madrid) el haberme facilitado el acceso a laboratorios y a equipos para realizar el presente trabajo de investigación.

Quiero agradecer infinitamente a todas las personas que se han cruzado en mi día a día científico, a las que nombro a continuación y a las que dejo sin nombrar, por estos años estupendos de tesis.

A mis tres directores, Pepe, Marisela y José María, que me han permitido hacer este trabajo, me han guiado en él y de los que he aprendido aún mucho más de lo que imaginan.

A mis grandes Maestros: Ana Camacho, Pedro de Pablo, Carolina Carrasco y Jorge Cuéllar.

A los que tanto me enseñaron a través discusiones estupendas: Ricardo Arias, Xabi Aguirrezabala, Raúl Guantes, Iván López, MariCarmen Rodríguez, Hugo Yébenes, Jaime Martín-Benito y Javi Chichón.

A los grupos colaboradores que han aportado estos sistemas de estudio tan bellos, y concretamente a Juan Luis Ramos, Tino Krell, Manuel Carmona y Eduardo Díaz.

A mis colaboradores directos, y discutidores y también grandes maestros y amigos: Isa Cuesta, Gonzalo Durante, Euge Guazzaroni, Jesús Lacal y Johannes Mertens. (¡Qué enorme disfrute ha supuesto cada una de estas colaboraciones!).

A los inspiradores encontrados en el camino: Fernando Briones, Germán Rivas, Joaquín Pérez-Pariente, Xavier Fernández-Busquets, Nikolai Buzinsky y Daniel Stolik. Y a los inspiradores previos: Margarita Martín, Víctor Herrero, Margot Snel, JoseLuis Segura, Carlos Otero, Antonio Rey, JuanLuis Soria y MariCarmen Redondo.

A la gente tan agradable y tan accesible de Nanotec, que ha proporcionado siempre tan buena ayuda: Adriana Gil, Luis Colchero, Rafa Fernández, Nacho Horcas y Pablo Colilla.

A Olivier Piétremont del que tanto aprendí y que tanto tiempo me dedicó en el laboratorio de París, y a todo el grupo: Eric Le Cam, Sophie Lafosse, Jeanne Ayache, Fatima Boukhalfa-Heniche, Martial Kouda, Etienne Delain, Anne De Cian, Christophe, Sébastien Lyonnais e Isilda, que uno a uno me acogieron y cuidaron y animaron y enseñaron tanto con sus conversaciones, y que tuvieron paciencia infinita con mi francés.

A mis compañeros de faena del día a día y amigos tan queridos: Silvia Hormeño, Pablo Mateos y María Ibarra.

A la gente estupenda que ha estado en el día a día en el CNB: JR Castón, Irene Saugar, Pili Cabezas, Cristina Patiño y Rocío Arranz, Cristina Risco, Alberto Fraile, Juan Fontana y Noe López, Juan Gómez Reino, Borja Ibarra, Roberto Miranda, M^a Ángeles Pérez, Alina Ionel, Marina Serna, Ana Beloso, Dani Luque, Nerea Irigoyen, Álvaro Peña, Ana Cuervo, Sonia Moreno, MariJose Rodríguez, Encarna Cebrián, Elena Pascual, José Jesús Fernández, Yacob Gómez, Rafa Núñez, Roberto Melero, Marta Gutiérrez *Principessa*, Miguel Sánchez e Inma Montanuy, Silvia Juárez, César Santiago, prima Ali Pérez... y a todo el personal del CNB, especialmente a Esther Calle, Micol Lagarde, Susana Ayerdi, MariSol Notario, María Hortal, Antonio Rojo y Nica Esteban.

A la gente querida que ha estado en el día a día en el Instituto Nicolás Cabrera: Sara Arganda, Marta Irimia, Marta Rivera, Amanda Sorribes, Bea García, Alfonso Escudero, Ileana Márquez, Judit Birkenfeld, Julián Daich, Javi Estrada, Ben, Gonzalo Polavieja, Marta Peno, Santi Casado, Mario Encinar... Y en el día a día de la UAM: Alejandro Barrantes, Álex Valbuena, Javier Sotres, David Olea, Merche Hernando, Jorge Ibáñez, Alberto Pascual, Elena López, Álex Guijarro, Juan Carlos Valle... y al personal de la cafetería de Ciencias y de Correos del campus de la UAM.

A los compañeros queridos de los cursos de doctorado: Bárbara Calisto y Nere Jiménez (*Brujis*), Javi Oroz, Héctor Díez, Sebastián Tanco, Pau Muñoz, Mertxe Alfonso, Silvia Ruci, Fran Reyes, Pablo Guardado, Ornella Castielli y Gustavo Fuertes, y a los profes más entusiastas (Juan Hermoso, Marta Bruix, Armando Albert, Margarita Menéndez, Manuel Hervás, Mireia García y Juan Cedano, en particular).

Y a todas las personas amadas con las que he compartido la otra parte del día a día.

Índice

Resumen del trabajo (Summary)

I.	INTRODUCCIÓN.....	17
I.1.	La Microscopía de Fuerzas y su aplicación en Biología.....	17
I.1.1.	INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA.....	17
1.1.a.	Interacciones implicadas.	
1.1.b.	Componentes del microscopio.	
1.1.c.	Caracterización dinámica: Curvas de Fuerza.	
1.1.d.	Caracterización topográfica: Modos de operación.	
I.1.2.	MEDIDAS EN LÍQUIDO.....	26
1.2.a.	Fuerzas de interacción	
1.2.b.	Modos de medida en medio líquido	
1.2.c.	Configuración. Celda líquida	
1.2.d.	Información proporcionada por las medidas en líquido.	
1.2.e.	Sistemas modelo: Las chaperoninas	
I.1.3.	TÉCNICA DE SUPERFICIES.....	34
1.3.a.	Características de la toma de imagen. Control de la fuerza y del <i>feedback</i> .	
1.3.b.	Descripción general de la preparación de la muestra para su caracterización mediante AFM en medio líquido	
1.3.c.	Empaquetamiento lateral de la muestra y orientación en superficie.	
I.1.4.	MOLÉCULAS INDIVIDUALES. Estadística.....	43
I.1.5.	ALTA RESOLUCIÓN.....	43
1.5.a.	Optimización de la sensibilidad. Cristales bidimensionales.	
1.5.b.	Artefactos de la imagen	
I.1.6.	TÉCNICA DINÁMICA. ESPECTROSCOPÍA DE FUERZAS.....	49
1.6.a.	Indentación. Nanomanipulación.	
1.6.b.	Interacciones intra e inter-moleculares.	
I.1.7.	NUEVAS APLICACIONES DEL AFM.....	54
	Resolución temporal. Simulación <i>in vitro</i> de mecanismos biológicos.	

I.2.	La regulación de la transcripción.	57
I.2.1.	Transcripción en procariotas. La ARN-polimerasa, máquina transcriptora.....	58
I.2.2.	Regulación de la transcripción.....	59
I.2.3.	Técnicas empleadas en el estudio de los mecanismos de regulación	63
I.2.4.	Aportación del AFM al análisis de los mecanismos de regulación...	64
II.	OBJETIVOS DE LA TESIS.....	69
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
III.0.	Visualización de ADN mediante AFM.....	71
III.1.	Purificación del material biológico utilizado.....	72
III.2.	Formación y purificación de complejos nucleoproteicos.....	72
III.3.	Preparación de muestra.....	72
III.4.	Formación de los complejos y preparación de las muestras de cada sistema.....	73
III.5.	AFM. Toma de imágenes.....	75
III.6.	Tratamiento y análisis de imágenes.....	76
IV.	RESULTADOS.....	79
IV.1.	Regulación de la transcripción en <i>Pseudomonas putida</i> . Papel del represor TtgV en la regulación de la expresión del operón TtgGHI.....	79
IV.2.	Regulación de la transcripción en <i>Pseudomonas putida</i> . Papel de los factores de transcripción TodT (represor) e IHF (activador) en la regulación de la expresión del operón TodX.....	89
IV.3.	Regulación de la transcripción en el microorganismo <i>Azoarcus</i> sp. CIB. Papel del represor BzdR, de su efector benzoil-CoA, y del activador AcpR en la regulación de la expresión del operón catabólico bzdNOPQMSTUVWXYZA.....	101
IV.4.	Regulación de la transcripción en el bacteriófago Ø29.....	123

V.	DISCUSIÓN	153
V.1.	Caracterización estructural de complejos nucleoproteicos mediante AFM.....	153
V.2.	Estudio comparativo de los distintos sistemas de regulación de la transcripción estudiados.....	158
V.3.	Reestructuración del ADN inducida por factores de transcripción.....	163
V.4.	Modelos generales de los mecanismos de regulación de la transcripción: Modulación de la afinidad de la ARN-polimerasa por los promotores.....	166
VI.	CONCLUSIONES.....	175
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	177
VIII.	ANEXOS.....	189
VIII.1.	Abreviaturas, siglas y anglicismos.	
VIII.2.	Participación en congresos.	
VIII.3.	Publicaciones.	

Summary

This work presents the structural and functional characterization by Atomic Force Microscopy (AFM) of different nucleoprotein complexes involved in transcriptional regulation. Therefore its main objective is to study regulation mechanisms by resolving the implicated structures using a single molecule technique.

The Introduction has two sections: first it describes the AFM technique and its application in Biology. Secondly it describes the mechanisms that regulate gene transcription, and more specifically those that involve “transcription factor” proteins. This section also reviews the contributions of AFM to the study of nucleoprotein complexes. The special requirements of the technique when applied to these samples are presented in the Results chapters.

The training in the AFM technique took place along the development of a second project: the structural characterization of the macromolecular proteins known as “chaperonins”. The results obtained for these systems are used in the first section of the Introduction to illustrate and discuss the characteristics, possibilities and limitations of the AFM.

The Results section presents the four regulation systems studied in this thesis work. The results for each system are introduced and discussed in a separate subchapter. The AFM results are merged to pre-existing biochemical and biophysical data and the new information is used to propose functional models.

Chapter IV.1 presents the regulation system of the promoter P_{TtgGH1} of *Pseudomonas putida*. The repressor TtgV binds to the promoter region distorting the structure of the linear DNA. The protein-DNA complex is characterized at the single molecule level with AFM and the angle induced in the DNA by the protein is estimated from a statistical analysis of the distribution found in the structures observed.

Chapter IV.2 presents the regulation system of the promoter P_{TodX} of *Pseudomonas putida*. DNA structures of the binary and ternary complexes with the transcription factors TodT and IHF are described. The role of TodT repressor and that of the activator IHF are discussed according to the observed structures.

Chapter IV.3 presents the regulation mechanism of the promoter P_N of *Azoarcus* sp. CIB. The superstructure found for the nucleoprotein complex formed by the repressor BzdR when binding to the region of the promoter is described. The large complexity of the regulation model and the high resolution structural information provided by AFM to the study of this kind of systems is discussed, complementing and enriching existing data provided by biochemical and biophysical techniques.

Chapter IV.4 presents the system most extensively characterized in this thesis work: transcription regulation in the bacteriophage Phi29. This highly modulated process involves two transcriptional factors, p4 and p6, and the genome region containing promoters A2c, A2b and A3, located at the boundary between early and late transcribed genes. Building from the ideas presented earlier and using statistical approaches, this chapter presents and discusses the results acquired for the structure of complexes of growing complexity ([p4-DNA], [p6-DNA], [RNAP-DNA], [p4-p6-DNA] and [p4-p6-RNAP-DNA]). Control experiments follow and then a regulatory model suggested by these results is proposed. The transcription regulating complex of another virus, “Nf”, was studied to explore if the functional structure suggested for the Phi29 system was shared by analogous viruses.

The discussion section analyses the difficulties derived from the study of these complexes, including both sample preparation for AFM and analysis of the results. Furthermore, all the structures resolved are compared and analysed in relation to their function in their corresponding regulatory models. General features are concluded at the end of this chapter and listed in the Conclusions final section.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La Microscopía de Fuerzas y su aplicación en Biología

I.1.1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA.

El microscopio de fuerzas atómicas (Atomic Force Microscope, AFM) pertenece a la familia de los *microscopios de campo cercano* o *de barrido con sonda*: “SPM” (scanning probe microscopes) que emplean una sonda (*probe*) para medir propiedades físicas en la escala nanométrica de la superficie que barren como son la fricción (Lateral Force Microscopy, LFM), la elasticidad y la adhesión (Phase Detection Microscopy, PDM), las propiedades magnéticas (Magnetic Force Microscopy, MFM; Magnetic resonance force microscopy, MRFM), las propiedades eléctricas como las variaciones de capacitancia (Scanning Capacitance Microscopy, SCM) o de densidad de carga (Electrostatic Force Microscopy, EFM), la conductividad térmica (Scanning Thermal Microscopy, SThM), etc. Algunos de estos microscopios a la vez que las propiedades de la superficie mencionadas registran la topografía (MFM, LFM, EFM, SThM).

Fue diseñado por G. Binnig, C.F. Quate y C. Gerber en 1986 (Binnig *et al.* 1986), inspirados por el Microscopio de Efecto Túnel (scanning tunneling microscope, STM) desarrollado por ellos mismos en 1982 en los laboratorios de IBM, en Zurich, junto con H. Rohrer y E. Weibel (Binnig *et al.* 1982). Esta última técnica permite caracterizar la superficie de una muestra conductora o semiconductora (de Platino en el experimento original) mediante el registro de la corriente túnel existente entre dicha superficie y una punta afilada conductora o semiconductora (originalmente de Wolframio) situada a distancia de decenas de angstroms en un entorno de ultra-alto vacío. La punta recorre línea a línea un área determinada de la superficie de la muestra, detectando su distribución de masa y de cargas y reconstruyendo su topografía con resolución tridimensional subnanométrica. En contraste, la microscopía de fuerzas permite analizar la estructura de superficies no conductoras y en un ambiente gaseoso (incluyendo el vacío) o líquido, registrando las fuerzas de interacción punta-superficie en lugar de una corriente de electrones.

Las microscopías de campo cercano han contribuido al desarrollo de la biología estructural. Las primeras incursiones en el análisis de muestras biológicas se realizaron mediante STM, depositando películas metálicas delgadas sobre las muestras y analizando la superficie de la

máscara resultante con alta resolución (Baró *et al*, 1985). Más recientemente el uso del AFM se ha generalizado. La capacidad de caracterizar muestras no conductoras y la posibilidad de operar en medio líquido son características muy apropiadas para su aplicación al estudio de muestras biológicas. La presente tesis versa sobre la utilización de esta técnica en el estudio de dos sistemas biológicos: proteínas (chaperoninas) y complejos ADN-proteína (reguladores de la transcripción génica).

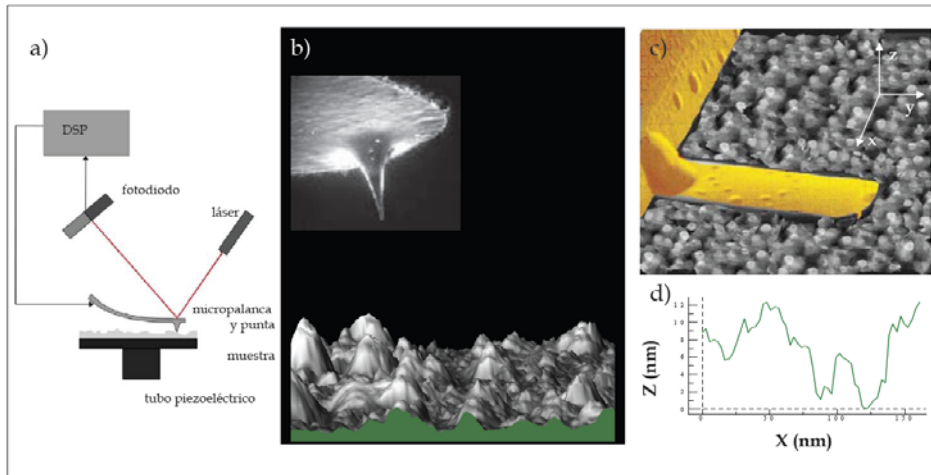


Figura I.1. El microscopio de Fuerzas Atómicas.

1.1.a. Naturaleza de las interacciones implicadas.

La fuerza de interacción entre la sonda y la muestra en la que se basa el funcionamiento del AFM está descrita por $F = -\partial V/\partial r$ y presenta una región repulsiva ($F > 0$) que corresponde a una situación de contacto entre punta y muestra y una región atractiva ($F < 0$) que corresponde a la ausencia de contacto (Figura I.2a). La interacción entre punta y muestra se reduce a la interacción entre los átomos en los extremos de la punta y de la muestra y es asimilable a un potencial de Lennard-Jones, que describe la interacción entre dos átomos o moléculas neutros situados a una distancia r (Figura I.2b). La ecuación en el recuadro de la Figura I.2 corresponde al potencial de Lennard-Jones, donde ϵ es la profundidad del pozo de potencial, σ la separación entre partículas para la que el potencial se hace cero, y $2^{1/6}\sigma$ la distancia del mínimo de energía. En este potencial se diferencian dos regímenes, uno repulsivo descrito por el término $(r)^{-6}$, y el otro atractivo descrito por el término $(r)^{-12}$. Las interacciones que engloba cada término son de distinta naturaleza: repulsivas de corto alcance (repulsión coulombiana), atractivas de largo alcance (fuerzas magnéticas y

electrostáticas) y de alcance intermedio (fuerzas de Van der Waals), y de adhesión, estas últimas con dos componentes principales: la de interacción estrictamente química entre ambas superficies, y la capilar que retiene la punta en contacto con la muestra debido a la fina película de líquido que recubre ambas superficies al operar en aire. Esta película de agua es de unas pocas monocapas de grosor y se encuentra adsorbida sobre toda superficie en condiciones de no vacío.

Las fuerzas de van der Waals (que comprenden las fuerzas de orientación, de inducción y de dispersión) son las que determinan a nivel atómico o molecular el funcionamiento de estos microscopios. Las que actúan entre dos cuerpos macroscópicos como son la punta y la superficie de la muestra se pueden calcular considerando tan sólo la contribución de las fuerzas de dispersión de London (de corto alcance), asumiendo que son aditivas. Suponiendo la punta como una esfera de radio R separada una distancia z de una superficie plana (la de la muestra) la fuerza de van der Waals vienen dada por la ecuación I.1, donde H (Julios) es la constante de Hamaker del material.

$$F_{vdW}(z) = -HR/6z^2 \quad \text{Ec.I.1}$$

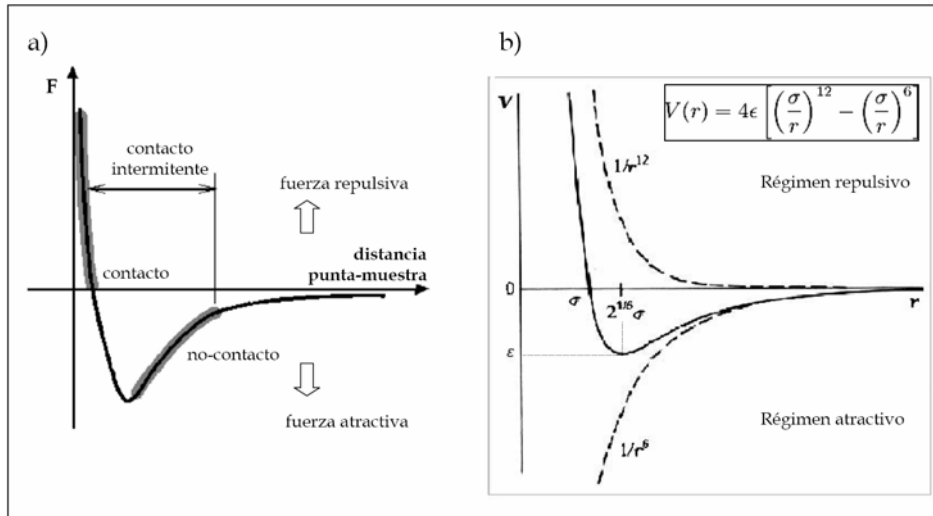


Figura I.2. Interacción sonda-muestra. a) Fuerza interatómica (punta-superficie) vs. distancia. b) Potencial de Lennard-Jones.

1.1.b. Componentes del Microscopio.

Presento a continuación el microscopio parte por parte, refiriéndome en la descripción concretamente al equipo de Nanotec Electrónica S.L. utilizado en esta tesis.

La **punta** (Figura I.1b) puede tener geometría piramidal o cónica y suele ser de Nitruro de Silicio (Si_3N_4), fabricada junto con la micropalanca generalmente de forma secuencial por deposición del Si_3N_4 sobre una oblea de Silicio con un pozo de geometría y dimensiones de la punta y posterior grabado con máscaras. Como se comentará en el epígrafe sobre alta resolución (1.5), el radio final de la punta y su longitud efectiva de penetración afectan a la resolución espacial de la imagen. Existen ya en el mercado puntas acabadas en nanotubos, soldados o crecidos a partir de ellas (Figura I.21b). Sin embargo su producción aún no es muy uniforme (Gupta *et al.* 2006).

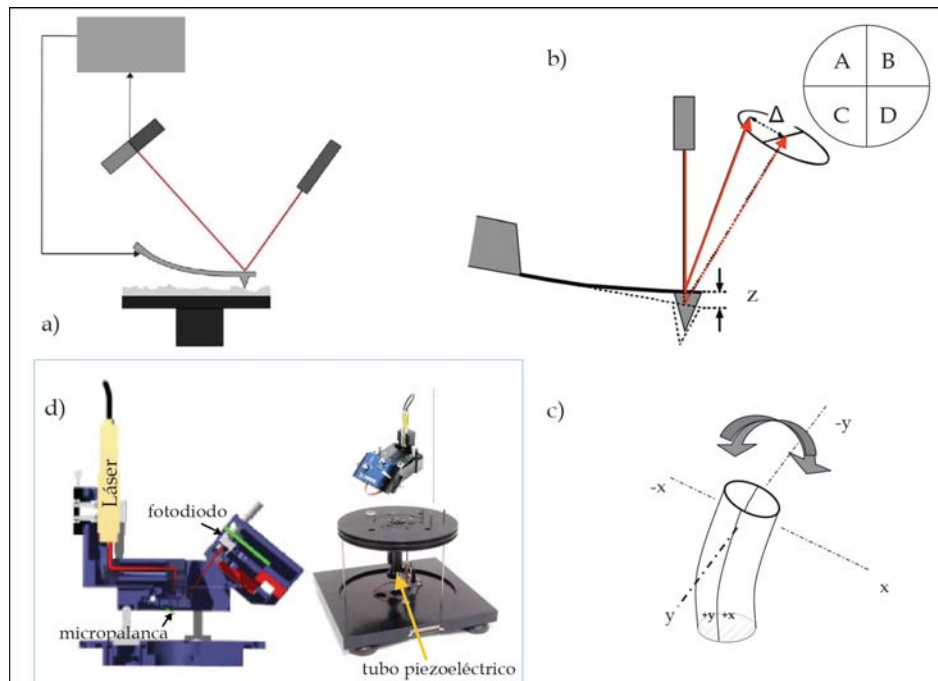


Figura I.3. Componentes del microscopio. a) Esquema general del AFM. b) Sistema de detección. c) Esquema del movimiento del piezoeléctrico. d) Cabeza y base del microscopio.

Las **micropalancas** (Figura I.1c) sobre las que se sitúa la punta (Figura I.1b) presentan un comportamiento mecánico asimilable al de un muelle elástico representado por la ley de Hook ($\mathbf{F} = \mathbf{k} \cdot \mathbf{x}$). La constante elástica de la micropalanca (k , [N/m]) delimita la sensibilidad de la medida, es proporcional a su frecuencia de resonancia (ν) y depende directamente de las dimensiones (longitud l y espesor t) y del material (módulo de Young, E). $k = E \cdot \nu \cdot t^3 / 4 \cdot l^3$. La tecnología actual permite

fabricar micropalanca de dimensiones y, por tanto, de constantes de fuerza muy pequeñas, como las empleadas en este trabajo (con un grosor de 800 nm y constantes de 0,76-0,05 N/m). Generalmente son también de nitruro de silicio, y están recubiertas en su dorso por una película de oro que refleja el haz láser.

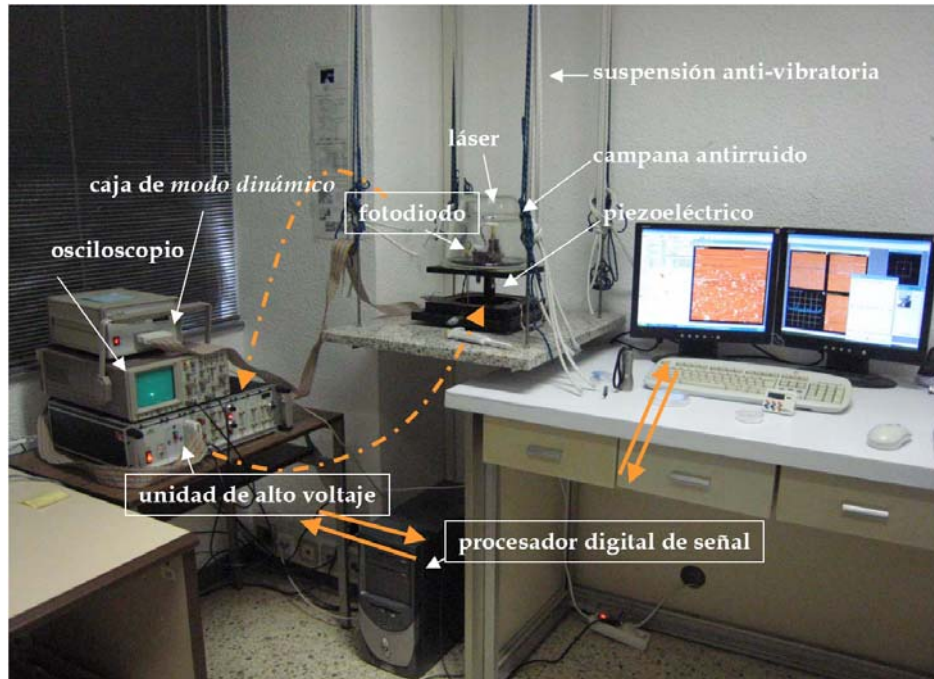


Figura I.4. El microscopio de fuerzas atómicas empleado en este trabajo de tesis. Las flechas en naranja indican el sentido de los intercambios de información entre las distintas unidades. (Las señales registradas por el fotodiodo son procesadas por la unidad de control en diálogo con la DSP (tarjeta localizada en la CPU del PC), que a continuación envían indicaciones al piezoeléctrico.

El **sistema de detección** empleado normalmente es óptico (**Figuras I.3.b** y **I.3.d**). Está basado en el registro de la flexión (lateral y vertical) de la micropalanca, medida a través del reflejo de un haz láser sobre un fotodiodo de cuatro cuadrantes. El láser se enfoca en el extremo de la micropalanca, por su cara superior, idealmente sobre la posición de la punta en la cara opuesta, y se refleja sobre su superficie recubierta de oro. El haz incidente es reflejado y detectado por un fotodiodo de cuatro cuadrantes (**Figura I.3b**).

El haz **láser** (con longitud de onda de 632nm (rojo) y de potencia menor que 1mW) es producido por un diodo y enfocado mediante un

sistema de lentes. Debe ser alineado manualmente (mediante un sistema de tornillos micrométricos) para que incida sobre el extremo de la micropalanca, que lo refleja, y centrado, también manualmente, en el detector, de forma que en estado de no contacto el cero de fuerzas laterales y verticales corresponda con el (0, 0) del fotodiodo.

El **fotodiodo (Figura I.3b)** realiza la comparación entre intensidades incidentes en cada par de sectores para determinar la fuerza entre punta y muestra, que proporciona en Voltios (convertibles a valores de pN-nN conocida la constante de la micropalanca).

El barrido se realiza moviendo con una trayectoria en zigzag bien la sonda sobre la muestra estacionaria o bien la muestra bajo la sonda estacionaria (como es el caso del diseño del microscopio empleado en esta tesis), registrando una línea $y_i(x, z)$ y a continuación la siguiente $y_{i+1}(x, z)$. Este movimiento se realiza gracias a un **tubo piezoeléctrico (Figura I.3c)**, compuesto por este material cerámico, con la capacidad de extenderse y contraerse con enorme precisión como respuesta a un voltaje aplicado (a su intensidad y a su polaridad). Cada línea (x, z) , de longitud fijada por el área de barrido elegida, está compuesta por un número 2^n de puntos (que en el microscopio empleado en esta tesis oscila entre 32 y 512 puntos) con lo que el tamaño del salto que debe realizar el piezoeléctrico entre dos puntos de medida depende de ambos parámetros: el área barrida y el número de puntos registrados. Las superficies de barrido típicamente empleadas oscilaron entre $100 \times 100 \text{ nm}^2$ y $2,8 \times 2,8 \text{ }\mu\text{m}^2$. La calibración del piezo (nm/V) se obtiene a partir de la relación: [desplazamiento del piezo/voltaje aplicado].

Este tipo de escáneres son empleados en la mayoría de las microscopías SPM. Están compuestos por tres electrodos piezoeléctricos distintos que operan de forma independiente en cada dirección X, Y y Z. Aplicando un voltaje de corriente alterna distinto para cada uno de los tres ejes (y previa calibración con muestras patrón) se logra el movimiento requerido para el barrido en X e Y (direcciones de barrido rápida y lenta, respectivamente) y el movimiento vertical (en Z), que corrige la altura en respuesta a la señal registrada en el fotodiodo y procesada en la electrónica.

El mapa topográfico se obtiene en la mayoría de las medidas manteniendo la fuerza entre la punta y la muestra constante durante el barrido, esto es: manteniendo la deflexión constante, y para ello un **circuito de realimentación** (o *feedback*) recibe los cambios registrados en el fotodiodo y calcula el voltaje que se aplicará al piezo en Z para que se contraiga o expanda convenientemente.

La **electrónica de control**, compuesta por una unidad de alto voltaje y una tarjeta con un procesador digital de señal (DSP) (señaladas en

la **Figura I.4**) opera con la señal de error resultante de la comparación entre la señal medida y un valor esperable, y la usa como señal de alimentación del *feedback* que hará reaccionar a su vez al piezoeléctrico.

El microscopio se posa sobre una mesa anti-vibratoria o se cuelga del techo (**Figura I.4**), para amortiguar todo ruido mecánico externo de baja frecuencia que puede solapar con el de la micropalanca (el uso de micropalancas con frecuencias de resonancia altas también reduce los efectos de ruidos de baja frecuencia). La cabeza del microscopio se tapa con una campana de vidrio para proteger de vibraciones acústicas, y mantener el ambiente en condiciones de humedad y temperatura estables.

1.1.c. Caracterización dinámica. Curvas de fuerza

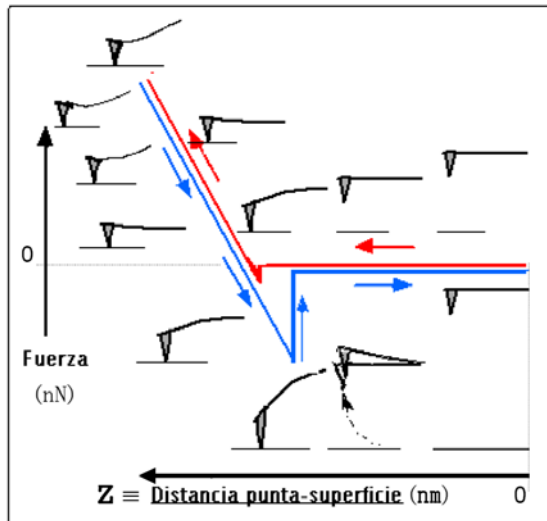


Figura I.5. Curva de Fuerza-distancia (punta-superficie)

Para calcular la fuerza ejercida sobre la muestra se realizan curvas de fuerza-distancia, basadas en un ciclo de aproximación y alejamiento de la punta a la superficie registrando la deflexión del haz láser a distintos puntos de la separación entre ambos (siendo estrictos, se trata de una curva que relaciona la deflexión medida por el fotodiodo con la extensión del piezoeléctrico). Esta deflexión (en voltios) se traduce a continuación en valores de fuerza gracias a la constante de fuerza de la micropalanca (N/m) y a la pendiente de la región lineal de la curva (V/m).

$$F(\text{nN}) = \text{deflexión (V)} \cdot \text{sensibilidad (nm/V)} \cdot k (\text{nN/nm}) \quad \text{Ec.I.2}$$

En la **Figura I.5** se representan una curva de fuerza tipo, y el estado de la micropalanca a distintas distancias de la muestra. Como ya se ha descrito (**Figura I.2b**), el perfil de la curva de fuerza punta-muestra se aproxima a la de la derivada del potencial de interacción del tipo Lennard-Jones de dos cuerpos aproximándose entre sí. Las curvas registradas por el AFM generalmente se encuentran invertidas, como la de la **Figura I.6a**, que paso a describir.

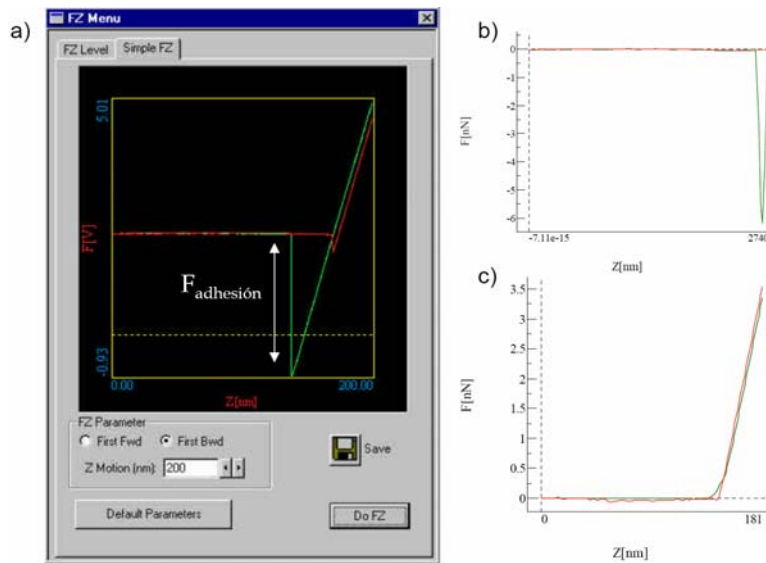


Figura I.6. Interacción sonda-muestra. a) Curva de Fuerza vs. distancia registrada en el AFM. La fina capa de agua presente en toda superficie al aire se manifiesta en la parte de adhesión de la curva, introduciendo grandes diferencias entre las curvas de extensión (roja) y de retracción (verde). b) Curva de Fuerza tomada en aire c) Curva de Fuerza tomada en medio líquido (donde la adhesión se minimiza al no haber contribución de las fuerzas capilares).

En la parte izquierda de la curva el piezoeléctrico se encuentra totalmente retraído ($Z = 0$ nm). No existe contacto entre punta y muestra y la deflexión de la micropalanca por tanto es 0 V (y 0 N). Ésta se mantiene inalterada conforme se extiende el piezoeléctrico ($Z > 0$ nm) aproximando así la muestra a la punta, hasta que llega a una distancia suficiente para que la punta experimente la atracción de la fuerza de van der Waals. A continuación la punta entra en contacto con la superficie, y en consecuencia la micropalanca se flexiona hacia ella. La extensión sucesiva del piezoeléctrico provoca un contacto ahora repulsivo entre punta y muestra, lo que se traduce en la flexión inversa de la micropalanca y en una respuesta lineal de la deflexión. Tras la extensión total, o la fijada

como parámetro de la curva, el piezoeléctrico comienza a retraerse. La deflexión de la micropalanca sigue idéntica trayectoria que en el acercamiento (en ausencia de histéresis del piezoeléctrico) y sólo varía su comportamiento. Sin embargo, en el punto de entrada en contacto: la punta se mantiene adherida a la superficie, queda “retenida” por ésta, debido a las fuerzas de adhesión, y esto genera una deflexión negativa, de la micropalanca hacia la superficie.

En medidas en aire, las fuerzas capilares de la película de agua, junto con otras fuerzas de adhesión, mantienen la punta y la muestra en contacto, flexionando la micropalanca, hasta que se produce la separación. Ésta se registra como un salto súbito en la señal de deflexión hacia el cero, valor que se mantiene hasta el final con la retracción del piezoeléctrico (**Figura I.6b**). La magnitud de esta fuerza de adhesión depende del espesor de la película de hidratación. En medidas realizadas con la punta y la muestra sumergidas en líquido no se produce la formación de un cuello de agua entre ellas y en consecuencia la fuerza total ejercida por la punta sobre la muestra es menor.

Las variaciones locales en la curva implican un cambio en las propiedades elásticas locales de la muestra, como se verá en los apartados de espectroscopía de fuerzas. El análisis de las curvas de fuerza puede aportar además información importante sobre las propiedades de elasticidad, dureza, adhesión, distribución de cargas y la propia constante de Hamaker del material (Capella *et al.*, 1999; Butt *et al.*, 2005).

1.1.d. Caracterización topográfica. Modos de operación.

Las tres clases distintas de operación del microscopio son:

Modo de contacto: opera en el régimen de contacto, donde predominan las fuerzas repulsivas de corto alcance (**Figura I.7a**). La distancia punta-muestra es de pocos Angstroms. Durante el barrido se mantiene constante la fuerza normal, *i.e.*: la deflexión de la micropalanca, y se mide la fuerza lateral a partir del registro de la torsión de ésta.

Modo dinámico: opera en el régimen de no-contacto, a una distancia punta-muestra que oscila entre las decenas y las centenas de Angstroms, donde predominan las fuerzas atractivas de largo alcance. Un segundo piezoeléctrico hace resonar la micropalanca, sea con amplitud constante (A_0), sea con frecuencia constante (v_0), de forma que las variaciones en frecuencia o en amplitud (respectivamente) se hacen corresponder con cambios topográficos (**Figura I.7b**) y los cambios en otros parámetros, por ejemplo: el desfase respecto de la excitación externa, con cambios magnéticos de la muestra (García *et al.*, 2002).

Modo de contacto intermitente o de salto (*jumping mode*): En cada punto de la imagen se toma una curva de fuerza reajustando cada vez la distancia punta-muestra para que la fuerza normal ejercida no supere la de referencia (el *setpoint*) y registrando la altura Z a esa fuerza y la adhesión y la pendiente de la curva para generar los mapas de topografía, de adhesión y de rigidez (**Figura I.7c**). El desplazamiento al punto consecutivo tiene lugar fuera del contacto con lo que se minimiza el tiempo de interacción entre la punta y la muestra y la potencial alteración de ésta. Se trata de un modo más lento que los otros por la cantidad de puntos intermedios tomados para cada curva (*jump sample*), proporcionales al tamaño del salto (*jump off*), y por el tiempo de espera entre cada ciclo (*control cycles*), que por otro lado ofrece un control más fino de la fuerza y es por tanto menos agresivo en las muestras blandas (Moreno-Herrero *et al.*, 2004). Se trata del modo más empleado en esta tesis.

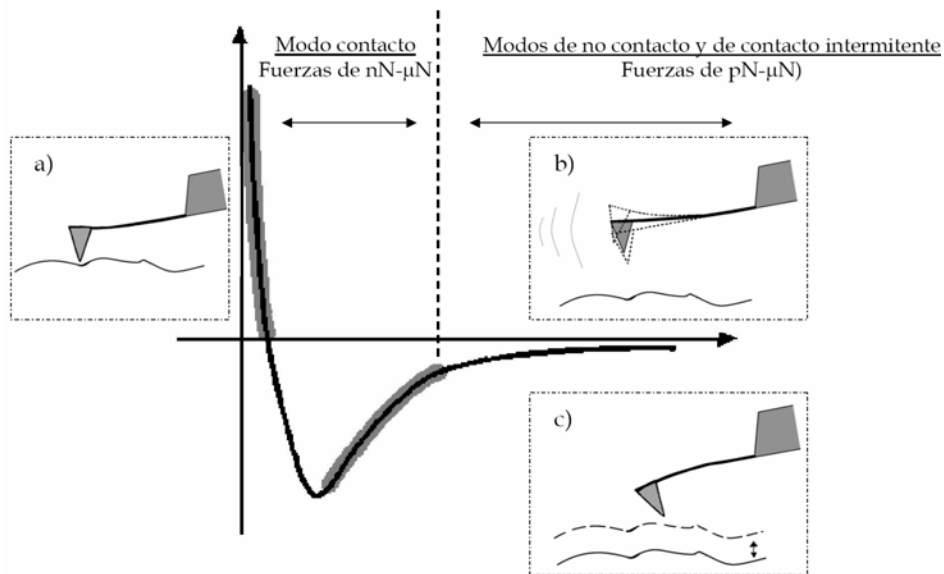


Figura I.7. Modos de operación. a) modo de contacto. b) modo de no contacto ("dinámico" o de *tapping*). c) modo de contacto intermitente (de *jumping*).

I.1.2. MEDIDAS EN LÍQUIDO.

La **Microscopía de Fuerzas Atómicas** (AFM) es una técnica idónea para la caracterización estructural de especímenes biológicos debido a su capacidad de operar en un medio líquido próximo al medio fisiológico y de observar en tiempo real procesos biológicos que estén ocurriendo en

dicho medio (Müller *et al.* 2002a, Cohen *et al.* 2008). Asimismo, permite inducir y determinar *in situ* distintas conformaciones del espécimen, caracterizar sus interacciones con otros especímenes (topológica y dinámicamente) y manipularlo a nivel de moléculas individuales para caracterizar sus propiedades mecánicas (de Pablo *et al.* 2003, Ivanovska *et al.* 2004, Czajkowsky *et al.* 2004, Schwaiger *et al.* 2005, Carrasco *et al.* 2006; 2008b).

Aparte de la posibilidad de operar en medio líquido y de extraer información cinética y dinámica, la ventaja más significativa que presenta la Microscopía de Fuerzas respecto de la cristalografía de RayosX y de la Microscopía Electrónica (a cuyos resultados estructurales complementa) es su elevada relación señal/ruido, lo que permite estudiar directamente (sin procesamiento intermedio de señal) imágenes de especímenes biológicos nativos (libres de agentes de contraste). Además, el AFM resuelve directamente la estructura en el eje Z, y, frente a las imágenes de proyección de la Microscopía Electrónica, proporciona un perfil topográfico con resolución subnanométrica (menor que la resolución atómica característica de las medidas de AFM en muestras sólidas, debido a la naturaleza “blanda” o “flexible” de las muestras biológicas).

1.2.a. Fuerzas de interacción

La interacción punta-muestra en medio líquido es algo distinta a la descrita para las medidas en aire y queda explicada por la “teoría DLVO” (Israelachvili, 1998. págs. 246-256), que surge de las propuestas de Derjaguin y Landau (1941) y de Verwey y Overbeek (1948). La fuerza predominante es la electrostática establecida entre las cargas superficiales de punta y muestra (entre la doble capa de Debye de ambas superficies), *i.e.* la fuerza EDDL (*electrostatic Debye double-layer*) de la ecuación I.3, mientras que las contribuciones de las fuerzas de van der Waals y de las fuerzas capilares se reducen hasta hacerse casi despreciables. Esta doble capa de Debye resulta del conjunto de los iones del medio líquido dispuestos en torno a una carga, y en este caso en torno a las cargas distribuidas por una superficie. Su grosor (λ_D) depende de la naturaleza de los iones del medio, de su poder polarizable o polarizante, *i.e.* de su carga y de su radio iónico (Ecuación I.4). Al aproximar punta y muestra, se establece una fuerza entre ambas densidades de carga que podrá ser modulada por las cargas (las sales y el pH) del medio acuoso. De ahí la importancia de la elección del tampón de imagen al trabajar con muestras blandas, buscando operar a fuerza mínima (**Figura I.8**). Esta relación se discutirá en sucesivas ocasiones en esta tesis.

I.1. Introducción

$$F_{EDDL} = \frac{4\pi\sigma_s\sigma_t R\lambda_D}{\epsilon\epsilon_0} e^{-r/\lambda_D} \quad \text{Ec.I.3}$$

$$F_{DLVO} = \frac{4\pi\sigma_s\sigma_t R\lambda_D}{\epsilon\epsilon_0} e^{-r/\lambda_D} - \frac{HR}{6r^2} \quad \text{Ec.I.4}$$

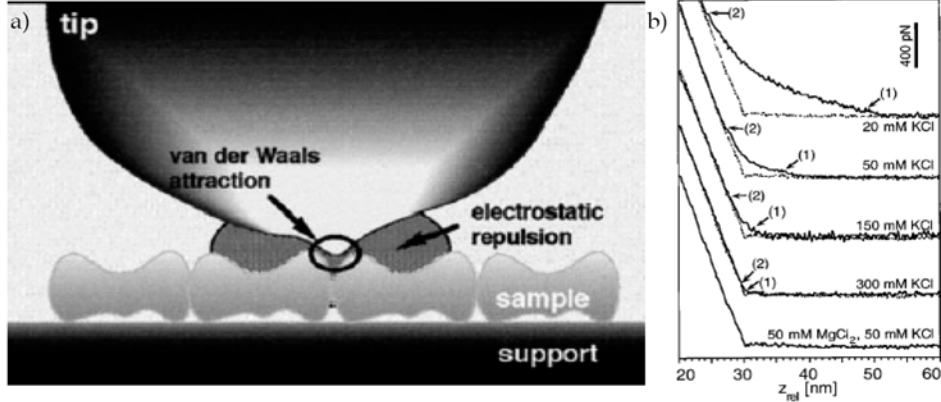


Figura I.8. Teoría de DLVO. Existen modelos empíricos (Müller *et al.* 1999) que relacionan la fuerza ejercida por la punta sobre la superficie y la naturaleza del tampón de toma de imagen (de la fuerza iónica y de los cationes presentes). **a)** Esquema del radio de acción de las fuerzas implicadas en la interacción punta-muestra en un medio líquido con cargas disueltas en ausencia de $F_{aplicada}$. La fuerza EDDL (aquí señalada como “electrostatic repulsion”) es de largo alcance y actúa sobre un área mucho mayor que las de van der Waals. La fuerza efectiva resulta de la suma de $F_{aplicada} + F_{EDDL} + F_{vdW}$ y puede minimizarse haciendo negativa la F_{EDDL} para compensar las otras dos, logrando condiciones de medida con una fuerza menor que la aplicada por el microscopio. **b)** Curvas F-z registradas sobre una misma superficie proteica a pH constante y fuerza iónica variable. Las flechas indican (1) el efecto de la repulsión electrostática (respecto de la curva inferior, tomada en ausencia de repulsión) y (2) la fuerza a la que la punta y la muestra entran en contacto. (Figuras extraídas de Müller *et al.* 1999).

1.2.b. Modos de medida en medio líquido

En medio líquido es posible trabajar en los tres modos de medida descritos. Sin embargo el menos agresivo para el material biológico resultó ser el modo de salto (**Figura I.9**) y el principal usado en esta tesis, a pesar de que ralentiza la medida. La toma de una imagen puede durar hasta varios minutos en contraste con la velocidad de 20 s/imagen alcanzable con modo dinámico (Moreno-Herrero *et al.*, 2002). El tamaño del salto elegido es siempre unos pocos nm mayor que la altura del espécimen analizado y la fuerza ejercida osciló entre los 20 y los 100 pN.

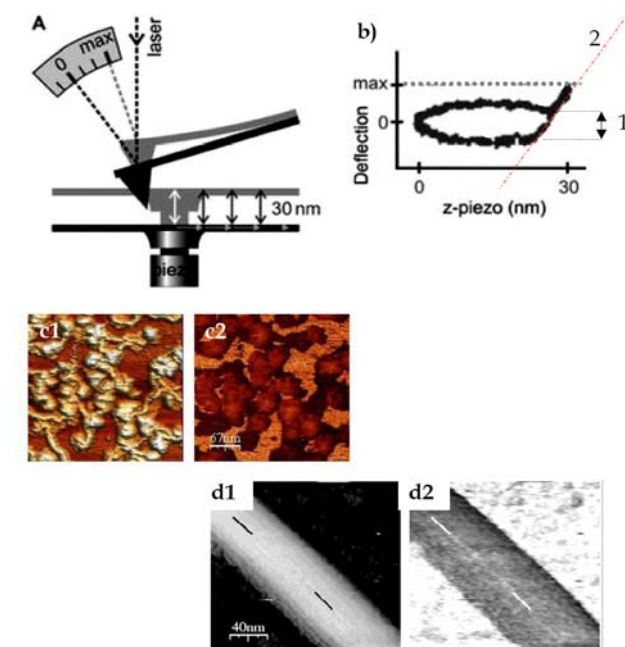


Figura 1.9. Modo de salto “Jumping mode” en líquidos. **a)** Esquema del estado de la micropalanca en los dos extremos del salto en el modo *jumping*. En más oscuro se representa la posición en la que el piezoeléctrico retirado, y por tanto la micropalanca alejada de la muestra, fuera de contacto (y con fuerza cero). En esta posición se efectúa el desplazamiento lateral al siguiente punto de la imagen. En más claro se representa la posición del conjunto en el extremo del salto, cuando se ha alcanzado la fuerza establecida como *setpoint*. A continuación el piezoeléctrico se retira el tamaño fijado para el salto (en este caso de 30 nm) y se desplaza hacia el siguiente punto. Este ciclo da lugar a la curva F-z que el microscopio registra en cada punto de la imagen con una fuerza máxima establecida como parámetro por el usuario. La imagen topográfica se construye a partir de la distancia vertical a la muestra a la que se alcanza el valor de la fuerza predeterminado. **b)** representa la curva tal y como aparece en el osciloscopio. Puesto que la medida es en líquidos las fuerzas capilares de adhesión punta-muestra se anulan. Simultáneamente al registro del mapa topográfico se registran la adhesión de la curva F-z (1) y la pendiente de la misma (2) para generar los correspondientes mapas de adhesión y de rigidez o *stiffness*. (Figura extraída de Schaap *et al.*, 2004). **c)** Mapas de topografía (c1) y adhesión (c2) registrados mediante el modo *jumping* simultáneamente sobre una muestra de agregados proteicos unidos a ADN. La escala de colores varía, al igual que la topográfica con la altura, de más oscuro (menor adhesión) a más claro (mayor adhesión). **d)** Mapas topográfico (d1) y de rigidez (*stiffness*) (d2) registrados simultáneamente de un microtúbulo sobre la mica (Schaap *et al.* 2006) con idéntico código de colores (más claro cuanto más rígido).

1.2.c. Configuración. Celda líquida

A lo largo de este trabajo se ha utilizado una celda líquida de configuración abierta. La muestra se deposita sobre un disco de mica de

aproximadamente 0.5 cm de diámetro colocado sobre un disco de teflón. La punta se introduce en la gota de un volumen aproximado de 50 microlitros, con lo que tanto la punta como la muestra quedan sumergidas en el mismo tampón de toma de imagen. El líquido queda contenido en la parte superior por una ventana de zafiro que focaliza el láser sobre la muestra. Existen también celdas cerradas que permiten introducir y retirar líquidos del compartimento y así intercambiar el tampón de imagen o inyectar proteínas o moléculas para observar en tiempo real las modificaciones que puedan inducir en la superficie (**Figura I.14b**).

1.2.d. Información proporcionada por las medidas en líquido (topografía, adhesión, electrostática, flexibilidad, rigidez...)

Además de la topografía, la operación en modo *jumping* permite medir directamente otras propiedades como la **adhesión** o la **rigidez** (*stiffness*). En la **Figura I.9c** se presentan los mapas topográfico (**c1**) y de adhesión (**c2**) de una muestra de complejos nucleoproteicos registrados simultáneamente con el modo de *jumping*. El mapa de adhesión revela la diferente composición química (o carga superficial) de las superficies de mica, ADN y proteína. Se construye a partir de los valores de la adhesión de la curva de fuerza tomada en cada punto analizado (indicada como “1” en la **Figura I.9b**). La **Figura I.9d** muestra los mapas de la topografía (**d1**) y la rigidez (**d2**) de un microtúbulo (Schaap *et al.* 2006). La rigidez en cada punto de la imagen se extrae de la pendiente de la región de contacto de la curva F-z del salto en ese punto (indicada como “2” en la **Figura I.9b**). El mapa demuestra la mayor rigidez de la mica que la del microtúbulo.

Debido a que las imágenes topográficas se construyen a partir de la medida de la fuerza de interacción entre la punta y la muestra cuando entran en contacto, es posible extraer del mismo tipo de experimento información sobre la distribución de cargas y la flexibilidad estructural de la superficie.

La punta (de nitruro de silicio) está cargada negativamente (con una densidad de carga superficial ~ -0.032 C/m²) y detecta repulsiones electrostáticas locales cuando la superficie presenta cargas negativas discretas. Así, la topografía obtenida es resultante de la mezcla de estructura y electrostática (**Figura I.10.aC**; Müller *et al* 2002a). Los **mapas electrostáticos** o de distribución de cargas de la superficie se obtienen variando la **fuerza iónica** y manteniendo constantes la punta, la muestra, la fuerza de la toma de imagen y el pH del tampón. Un mapa diferencial (que reste la topografía obtenida en ausencia de contribuciones

electrostáticas) mostrará el mapa electrostático de la superficie. Las **Figuras I.10.aF y I.10.aG** muestran los mapas promedio de la topografía de los trímeros del canal de la porina OmpF, registrada a distintas concentraciones de electrolitos.

Los **mapas de flexibilidad estructural** de la **Figura I.10.b** son mapas de desviación estándar de la imagen media (mediante promediado bidimensional de partículas individuales; Müller *et al.* 2002b). Se detectan flexibilidades de dominios estructurales correspondientes a energías de deformación del orden de 3-12 KJ/mol, ~1000 veces menor que los trabajos de indentación (2500KJ/mol).

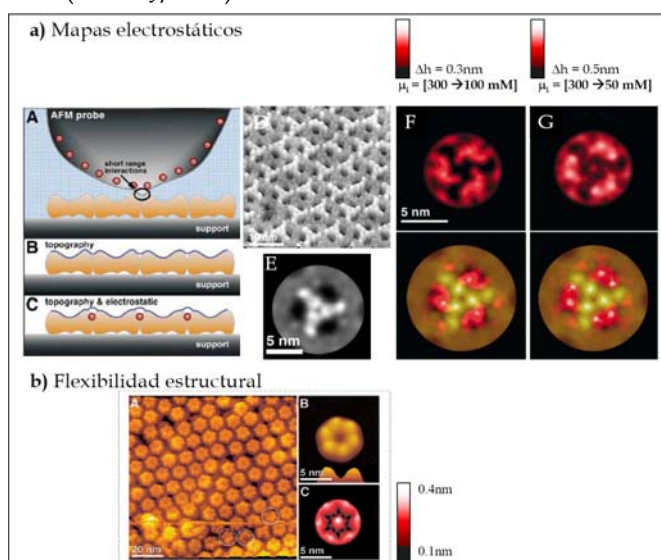


Figura I.10. a) Mapas de potencial electrostático del canal de la porina OmpF. A) Principio de la contribución de la variable electrostática en el registro de la topografía mediante una punta de AFM cargada negativamente (de Nitruro Silicio). **B)** La topografía de una superficie neutra revelada por dicha punta será la topografía “verdadera”. **C)** Si la muestra presenta cargas negativas discretas la punta experimenta repulsiones electrostáticas locales. La topografía resultante mezcla información estructural y electrostática que pueden ser descompuestas restando la imagen “B” (meramente topográfica) de la “C” (registrada en presencia de contribución electrostática). **D)** Mapa topográfico de la porina OmpF registrado a 300mM de KCl, donde se observa el ensamblaje de los trímeros individuales de la porina en un cristal 2D de celdas unidad rectangulares. **E)** estructura promedio de los trímeros realizada a partir de (D) imponiendo simetría 3. **F)** y **G)** muestran los mapas diferencia entre la topografía de la porina OmpF registrada a 100 y 300mM KCl (**F**) y a 50 y 300mM KCl (**G**). La escala de colores pasa del blanco (máxima diferencia de altura, de 0.3nm (**F**) y 0.5nm (**G**)) al negro (mínima: 0,05nm). Las figuras inferiores muestran la superimposición de la topografía promedio (marrón-dorado) y del potencial electrostático. La diferencia principal entre los

trímeros de la porina se encuentra por tanto en la entrada del poro transmembrana. (Müller *et al.* 2002a). **b) Flexibilidad estructural.** **A)** mapa topográfico de una placa de conexones (canales de comunicación intercelular en vertebrados) ordenados bidimensionalmente en un cristal. La buena resolución proporcionada por este ordenamiento lateral permite detectar defectos en subunidades individuales del conexón, señalados por circunferencias. **B)** Promedio de las partículas de (A) con una resolución lateral de 1,2nm. **C)** Mapas de desviación estándar de la imagen promedio de (B). La escala de desviaciones pasa del negro (0,1nm, mínimo) al blanco (0,4nm, máximo). La máxima desviación, situada en el poro del conexón, indica una variabilidad estructural intensificada de esta zona (Müller *et al.* 2002b).

1.2.e. Sistemas experimentales modelo: Las chaperoninas

A continuación se presenta una introducción sobre la aplicación de la microscopía de fuerzas en Biología en la que principalmente se usan como ejemplos los resultados del proyecto que ocupó los dos primeros años de esta tesis, con el que se consolidó el manejo de la técnica y se exploraron sus capacidades y particularidades. Este proyecto versó sobre la caracterización estructural y mecánica de los cambios conformacionales que se producen durante el ciclo funcional de las chaperoninas, inducidos por la unión, hidrólisis y liberación del nucleótido (**Figura I.11**). Estas proteínas presentan una estructura cilíndrica, formada por dos anillos apilados, a su vez constituidos por distintas subunidades, y tienen como función plegar otras proteínas que se encuentran desestructuradas, a las cuales reconocen a partir del dominio apical de sus subunidades (**Figura I.11B**). Una vez reconocidos, introducen los sustratos en la cavidad central donde se produce su plegamiento. Ya reestructurados, los sustratos son liberados, por reapertura de la cavidad al exterior.

Concretamente se estudiaron tres chaperoninas distintas: GroEL, de origen bacteriano (de *E. coli*), CCT, de origen eucariota ("Cytoplasmatic Chaperonin containing TCP-1", también llamada TRiC, y extraída de testículos de toro) y el termosoma de la arqueobacteria *Pyrococcus Horikoshii* (Martín Benito *et al.*, 2007b), ejemplos característicos de las dos familias de chaperoninas, de tipo I (el primero) y de tipo II (los dos últimos) (**Figura I.12**).

Las dimensiones de estas tres macromoléculas GroEL, termosoma y CCT (14.5, 17 y 17 nm de altura y 13.5, 15 y 15 nm de diámetro respectivamente, y ~4.5nm de diámetro del orificio abierto de la cavidad) y la magnitud de los cambios conformacionales asociados a su actividad enzimática, ya caracterizados por microscopía electrónica, exigen una resolución lateral mínima de 1 nm. Su observación mediante AFM requería

por tanto optimizar las condiciones de toma de imagen para alcanzar una resolución espacial inferior al nanómetro.

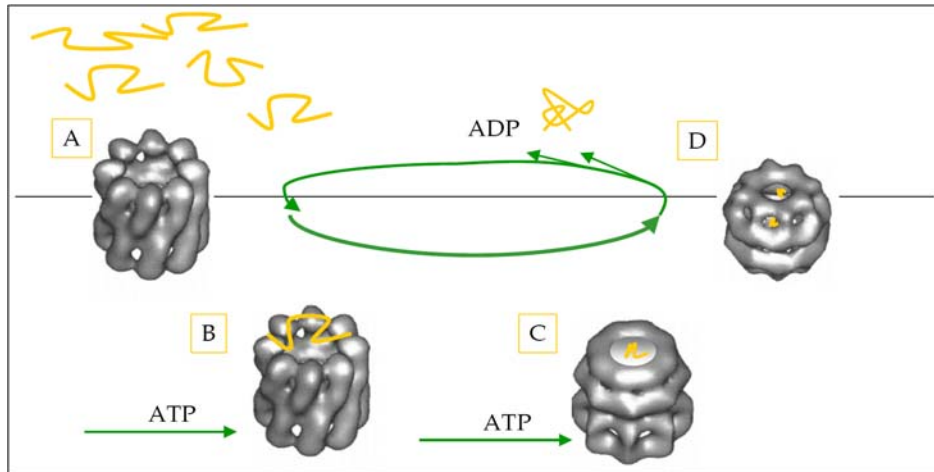


Figura I.11. Ciclo funcional de las *chaperoninas*, motores macromoleculares complejos. El mecanismo general de funcionamiento de las *chaperoninas* alterna dos conformaciones básicas: una conformación abierta, en ausencia de nucleótido, que reconoce al sustrato desnaturalizado cuyo plegamiento va a promover, y una conformación cerrada, inducida por la unión y posterior hidrólisis de ATP. El sustrato aislado en el interior de la cavidad queda libre de interacciones no deseadas y puede plegarse utilizando la información codificada en su propia secuencia aminoacídica.

Chaperoninas

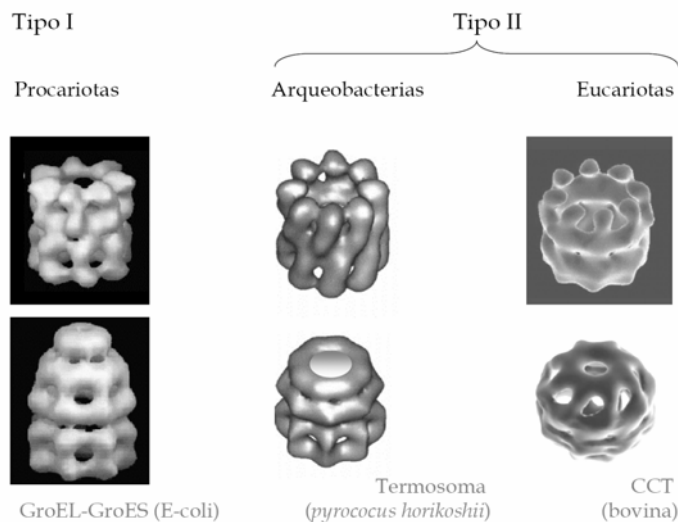


Figura I.12. *Chaperoninas* estudiadas, procedentes de organismos diversos. Reconstrucciones tridimensionales generadas mediante microscopía electrónica y

procesamiento de imagen, de las chaperoninas: GroEL (Carrascosa *et al.*, 2001), de un Termosoma distinto al estudiado, el "TF55", de *Sulfolobus shibatae*, (Schoehn *et al.* JMB, 2000) y de CCT, (Llorca *et al.* 1999), tanto en ausencia como en presencia de nucleótido. Las chaperoninas forman parte de un gran grupo de proteínas (las chaperonas moleculares) involucradas en el plegamiento de otras proteínas. Son grandes oligómeros (800-1000 KDa) constituidos por dos anillos que alojan una cavidad donde se produce el plegamiento. Existen grandes diferencias estructurales entre los ciclos funcionales de las chaperoninas del tipo I y las del tipo II. En el caso de las primeras, se sabe que la unión de ATP promueve la asociación de la chaperonina con un pequeño oligómero o "cochaperonina" y un cambio conformacional que cierra la cavidad y aísla el sustrato en su interior (en el caso de GroEL, la chaperonina de *E. coli*, esta cochaperonina se denomina GroES). En el caso de las chaperoninas del tipo II no existe una cochaperonina que colabore en el ciclo funcional. Ese papel, sin embargo, parece ejercerlo un dominio extra (ausente en las de tipo I) que cierra la cavidad en un momento del ciclo. Las chaperoninas del tipo II son también más complejas pues, a diferencia de las del tipo I, pueden variar en la simetría del oligómero (7 en las del tipo I; 8 ó 9 en el caso de las de tipo II) o en el número de subunidades distintas (1 en las del tipo I; 1,2,3 u 8 en las del tipo II) (Carrascosa *et al.*, 2001; Gutsche *et al.*, 1999; Llorca *et al.*, 2001), y discriminar entre sustratos, uniéndolos de forma específica a las distintas subunidades (Llorca *et al.*, 2001; Martín Benito *et al.*, 2002, 2007a).

I.1.3 TÉCNICA DE SUPERFICIES.

1.3.a. Características de la toma de imagen. Control de la fuerza y del *feedback*.

El control de la fuerza aplicada sobre la muestra y de los valores del *feedback* es la pieza clave para obtener imágenes lo más fidedignas posible de la muestra. Una fuerza demasiado débil no permitirá que la punta se agarre a la superficie ni por tanto que reproduzca su relieve (**Figura I.13c**). Por el contrario un exceso de fuerza puede interaccionar con la muestra y o bien generar mapas topográficos irreales, por deformación de las moléculas, o bien destruirlas como es el caso mostrado en las imágenes **a** y **b** de la **Figura I.13**.

El mal ajuste de los parámetros del *feedback* puede traducirse en que la punta no siga el perfil de la muestra (perdiendo el control en la parte descendente de los relieves perfilados, a pesar de aplicar un alto *set point*, como es el caso de la **Figura I.13c**, o que aparezca un ruido de fondo no deseado. El **ruido** procedente de la combinación de las fuentes de ruido eléctricas, mecánicas y acústicas es el factor limitante principal para la resolución vertical obtenible. El *feedback* presenta igualmente un límite superior umbral a partir del cual aparece ruido (**Figura I.13d**).

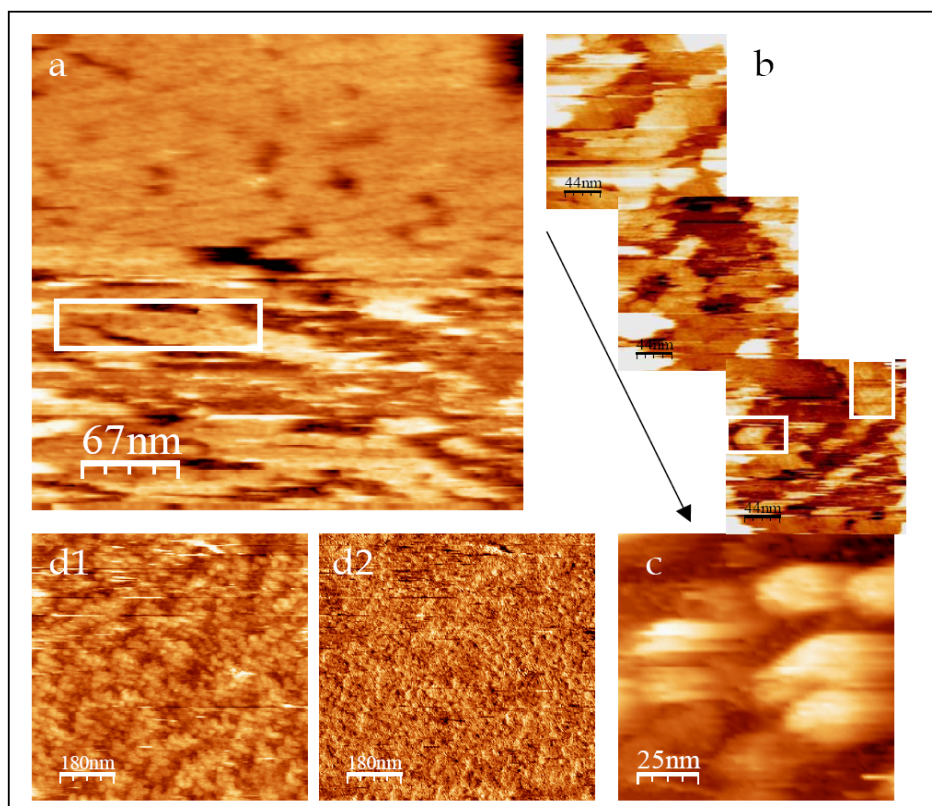


Figura I.13. Toma de imagen. Control de la fuerza y del *feedback* .

a) muestra el efecto de la fuerza aplicada en el barrido. Se aumentó el *set point* (o deflexión) durante el registro de una misma imagen, siendo el sentido del barrido de arriba a abajo. La fuerza inicialmente era inferior a la necesaria para resolver adecuadamente la topografía de la superficie. Con el aumento del *set point* se logró mejorar la calidad de la imagen (recuadro). Sin embargo un aumento sutil de la fuerza se traduce en la perturbación y el destrozo de la muestra, de naturaleza blanda, revelando la gran sensibilidad del sistema y lo delicado del manejo de las fuerzas. **b)** ilustra el efecto de barridos sucesivos sobre un mismo área con una micropalanca poco sensible (de constante de fuerza $> 1 \text{ N/m}$). La interacción punta-muestra no es inocua y se observa imagen a imagen cómo van desapareciendo moléculas, de estructura raramente resuelta (recuadros). El barrido con fuerza suficiente pero con un parámetro de *feedback* muy bajo produce imágenes como **c)**. Esta imagen es similar a la que resultaría de trabajar con una fuerza mínima sobre una muestra no muy bien adherida a la mica, y por tanto con una resolución insuficiente, como se discutirá en el apartado siguiente. **d)** Muestra el efecto del *feedback* aplicado en el barrido. **d1)** Los saltos y el ruido son introducidos por un aumento puntual del *feedback*. **d2)** Mapa de la Fuerza Normal registrada simultáneamente a la topografía de d1 (la fuerza o la deflexión registrada por la micropalanca durante la toma de imagen debería mantenerse constante pero experimentalmente se desvía del valor establecido cuando cambia la topografía de la muestra cambia).

1.3.b. Descripción general de la preparación de la muestra para su caracterización mediante AFM en medio líquido.

Las muestras de especímenes biológicos para su estudio mediante microscopía de fuerzas en medio líquido se preparan por incubación de una solución pura del espécimen, ya sea de proteínas, ADN, complejos, etc. sobre una superficie (Müller *et al.* 1997a). En este trabajo se usa la superficie del mineral mica recién exfoliado (concretamente de la mica muscovita: $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$) por proporcionar un sustrato cristalino atómicamente plano, y cargado negativamente (por las vacantes de K^+ que quedan al separarse dos láminas de mica) a la que adsorbe la muestra por interacciones electrostáticas (**Figura I.15**), modulables por la composición iónica del medio (Czajkowsky *et al.* 2003). El tiempo, la temperatura y la composición del medio líquido de incubación (pH, fuerza iónica y naturaleza iónica) modulan la eficacia de la fisisorción. La concentración del espécimen no es una variable tan crítica como sí lo es su pureza. A continuación, las etapas de lavado y equilibrado térmico preceden a la de medida.

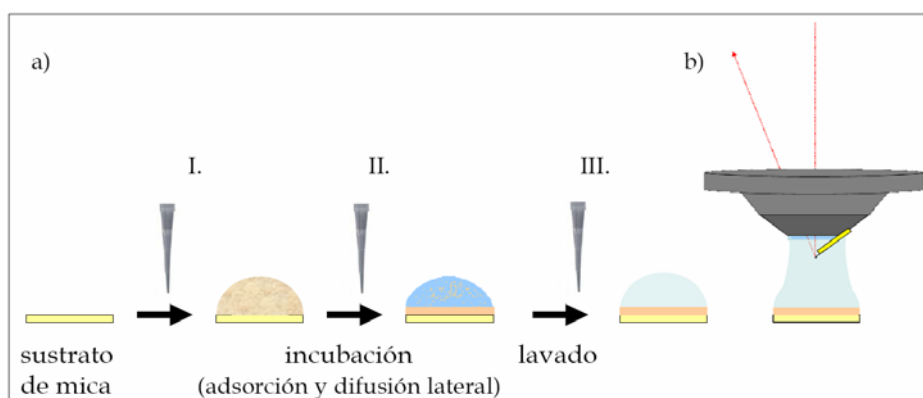


Figura I.14. Descripción general de la preparación de muestra. a) Pasos de preparación de la muestra: I. deposición de la muestra sobre un sustrato de mica. II. incubación sobre la superficie, lo que incluye: adsorción y difusión lateral. III. lavado, para eliminar el material excedente, no adsorbido. Re-equilibrio de la muestra en un nuevo tampón o a una nueva temperatura antes de pasar a ser caracterizado. b) Esquema de la celda líquida empleada en esta tesis: un cuello de tampón de medida formado entre el sustrato de mica y la lente que enfoca el láser, en el que quedan sumergidos la micropalanca y la muestra.

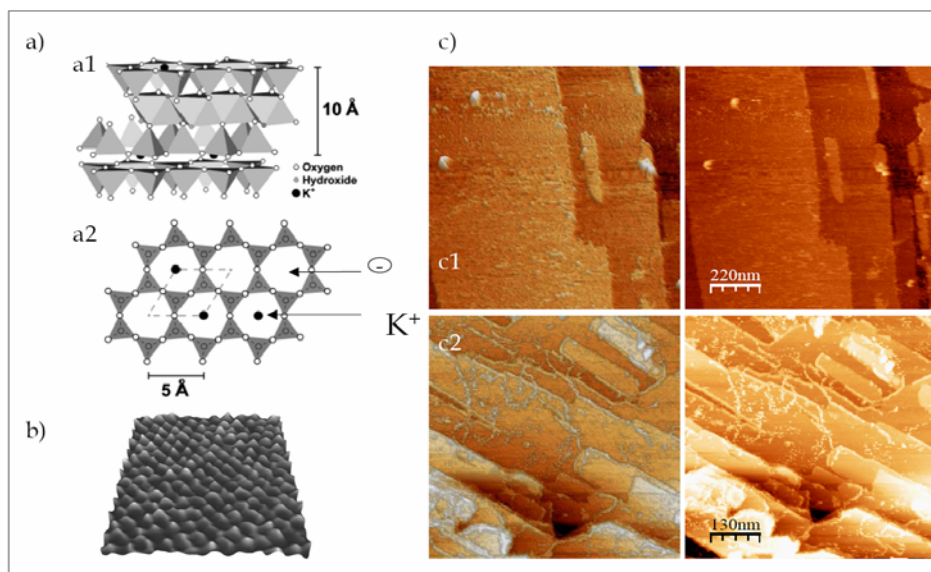


Figura I.15. Descripción del sustrato empleado: la mica.

a1) La estructura cristalina de la mica moscovita ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$) consiste en láminas apiladas de 10 Å de grosor, formadas por dos capas de tetraedros $[\text{SiO}_4]^{4-}$ con orientación opuesta entre sí, con cationes Al^{3+} haciendo de puente entre ellas unidos según coordinación octaédrica $[\text{AlO}_4(\text{OH})_2]$. **a2)** Las láminas a su vez están unidas por cationes K^+ , alojados entre las cavidades dejadas por las capas de tetraedros (imagen extraída de Czajkowsky *et al.*, 2003). Al exfoliar la mica se generan dos superficies atómicamente planas, con sólo la mitad de los huecos de potasio ocupados. Esto conduce a que la carga neta de la mica sea parcialmente negativa. En solución acuosa los cationes K^+ se desorben y solvatan, lo que aumenta la carga neta de la superficie. En presencia de otros cationes en la solución se producen intercambios y los huecos dejados por el K^+ son reocupados por otros cationes, tanto mono como polivalentes. La secuencia de afinidad descrita es $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ (Osman *et al.*, 1999). **b)** Imagen de AFM en aire con resolución atómica ($6,6 \times 6,6 \text{ nm}^2$, rango en z. 0-0,4nm), tomada por un NanoWizard® AFM (extraída de www.jpik.com). **c)** Superficies de mica con proteína (**c1**) y ADN (**c2**) ya incubadas sobre ellas. En ambos casos la exfoliación no fue limpia y en lugar de la superficie plana habitual se observa una estructura esquistosa, con terrazas de distintas alturas.

1.3.c. Empaquetamiento y orientación en superficie.

La resolución alcanzable con la microscopía de fuerzas está directamente relacionada con la interacción entre la punta y la muestra (Müller *et al.* 1997a) y con la sujeción de esta última al sustrato (Müller *et al.* 1999; Czajkowsky *et al.*, 2003). Ambos factores son modulados por el medio

acuoso, que condiciona la carga superficial de la punta, de la muestra y del sustrato. Las condiciones de barrido y de preparación de la muestra deben ser optimizadas para cada espécimen, lo que se logra variando la naturaleza, pH y fuerza iónica del tampón de toma de imagen y del tampón de incubación sobre la mica, así como la temperatura y los tiempos de esta incubación.

Cuando la punta es más gruesa que el espécimen que se pretende resolver se da el “efecto de punta” o convolución ilustrado en la **Figura I.16** y en la **Figura I.26c**. La imagen tomada en este caso no es “real” en las dimensiones X-Y (laterales) y sí en el eje Z. (El poder resolutivo de la punta, fijado por su diámetro final y el ángulo de cierre del vértice, y el control fino de la fuerza aplicada se discutirán en el epígrafe 1.5 de este capítulo, sobre el registro de imágenes de alta resolución).

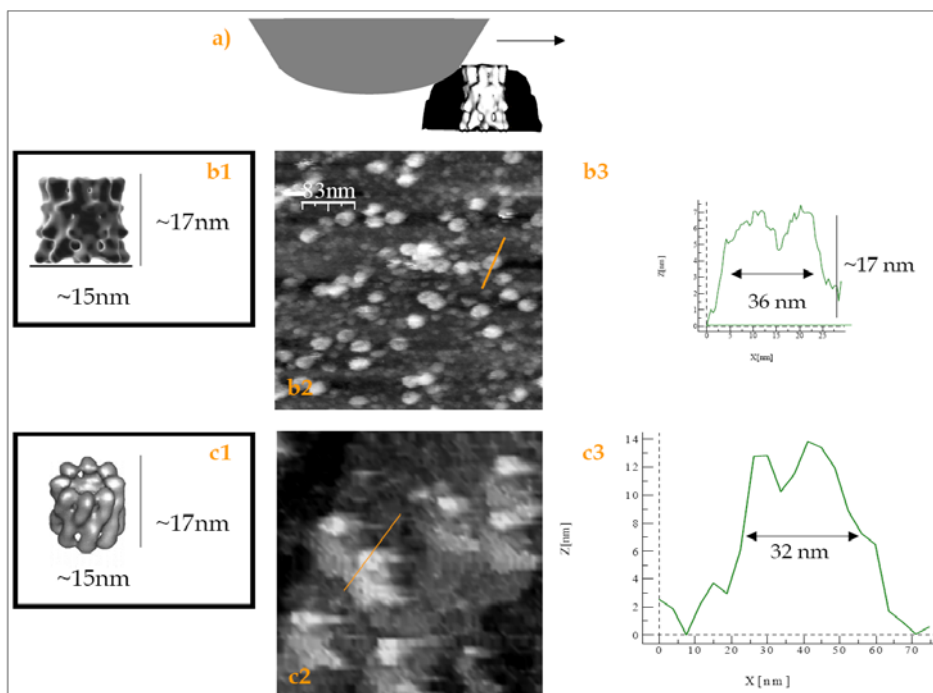


Figura I.16. Convolución de la punta. a) Esquema del fenómeno de “convolución de la punta”. b) y c) muestran ejemplos de imágenes tomadas en muestras con las chaperoninas CCT (b) y termosoma (c) diseminadas en la superficie donde se da este efecto. Mientras que las dimensiones laterales de los perfiles de la topografía (b3, c3) no se corresponden con las reales (b1, c1) debido a que el diámetro de la punta es mayor que el de las propias moléculas (i.e., debido al fenómeno de la convolución), la altura sí se corresponde.

Otro factor que afecta a la resolución lateral es el del desplazamiento de material debido al barrido de la punta sobre muestras débilmente adsorbidas al sustrato de mica. Como mostrado en la **Figura I.17**, si la muestra se encuentra empaquetada lateralmente el efecto del desplazamiento de material puede ser mitigado y la resolución mejora sustancialmente (llegando a resoluciones laterales subnanométricas). Existe también la opción de modificar químicamente la superficie de la mica (de “funcionalizarla”) para aumentar la adsorción de la muestra. Se emplean polilisinas, bicapas lipídicas u otras especies que modifican la carga neta de la superficie (Vinckier *et al.*, 1995). Otro modo de fijar la muestra a la superficie es por quimisorción individual de cada biomolécula, por ejemplo mediante anticuerpos, o por reconocimiento específico de residuos expuestos en su superficie (histidinas o cisternas). Estas alternativas, sin embargo, pueden reducir la resolución e introducen más variables al sistema, y acaso interferencias, de efectos no siempre inocuos ni controlables.

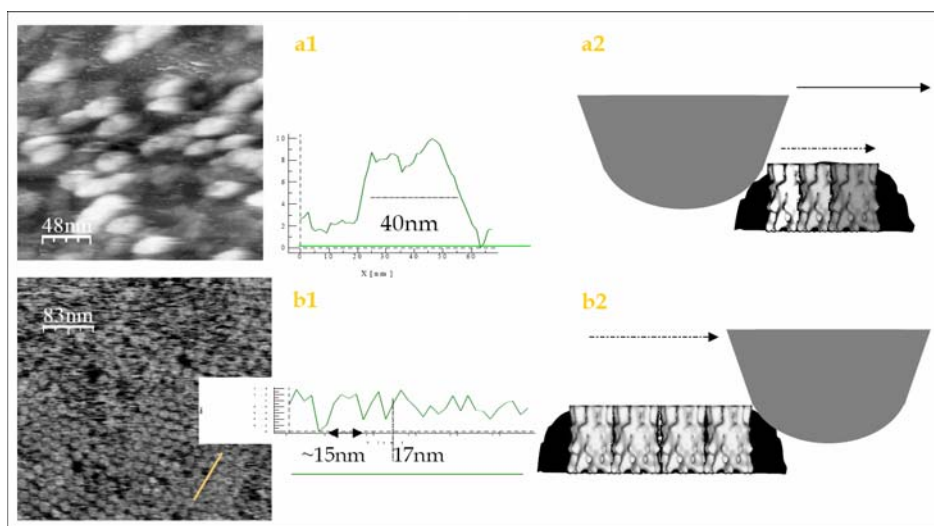


Figura I.17. Desplazamiento de material. **a1)** Topografía de una muestra no empaquetada lateralmente. El perfil correspondiente queda afectado por el efecto de convolución de la punta y por el desplazamiento del material sobre la mica, debido a una adhesión lábil entre el sustrato y las moléculas que ceden al empuje de la punta, como esquematizado en **a2**. **b1)** Un empaquetamiento compacto de GroEL impide el desplazamiento lateral de las moléculas debido a la punta y garantiza una resolución lateral ya sólo condicionada por el diámetro final de la punta. La convolución de la punta se dará casi exclusivamente en los bordes de las “islas” empaquetadas, como muestra el esquema de **b2**.

Asimismo, son comúnmente empleados agentes de fijación como el glutaraldehído o el formaldehído (este último específico para complejos nucleoproteicos) por su efecto estabilizador de las interacciones entre las

especies que forman un complejo y con ello de la estructura del mismo. No obstante se ha demostrado cuantitativamente su efecto rigidificador sobre la flexibilidad molecular (Schaap *et al.*, 2006).

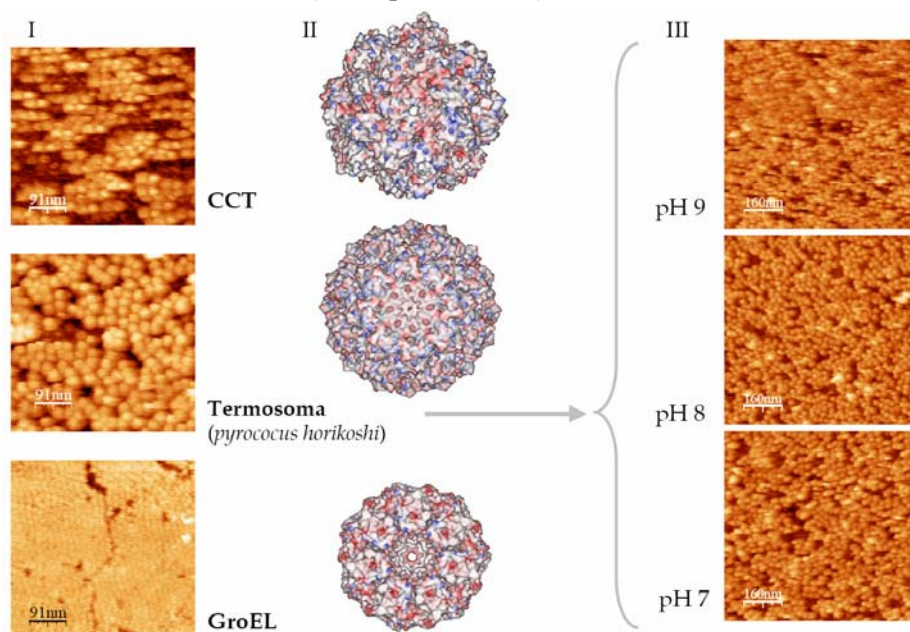


Figura I.18. Condiciones de incubación vs empaquetamiento. **I)** Las imágenes muestran la máxima compacidad alcanzada para el empaquetamiento sobre mica de CCT (3h de incubación de proteína con una concentración final de 0.015mg/ml en Tris ·HCl 10mM, pH 8.5, 5mM KCl, 5mM MgCl₂, 10°C), del termosoma (1h30 de incubación de proteína con una concentración final de 0.03mg/ml en Hepes 10mM, pH 7.5, 20mM LiCl, 10mM MgCl₂, T^aambiente), del que se muestra un barrido de condiciones de pH variable, y de GroEL (5-16h de incubación de proteína con una concentración final de 0.018mg/ml en Tris ·HCl 10mM, pH 7.5, 50mM KCl, 50mM MgCl₂, T^a ambiente). La adsorción y la difusión lateral son las responsables del empaquetamiento final, y el tiempo de incubación, la concentración de proteína y el medio de incubación (pH, fuerza iónica y naturaleza iónica) sus variables. **II)** Mapas de las cargas superficiales en la cara frontal de las tres chaperoninas. La distinta adsorción de cada especie, a iguales condiciones de incubación sobre la mica, se debe a las diferencias entre las distribuciones de cargas. Reconstrucciones de VMD a partir de los pdb's: 1oel de GroEL, 1a6d de Thermosome acidophilum y volumen de CCT de conejo, este último reconstruido y proporcionado por Paulino Gómez Puertas). **III)** Optimización del tampón de barrido, por variación de su pH, sobre una misma muestra de termosoma. (Imágenes de la misma muestra de termosoma, tomadas con una misma punta, en tampones de fuerza iónica constante (HEPES 10mM, 50mM MgCl₂, 50mM LiCl) y distintos pH).

Una estrategia seguida para aumentar la resolución es la de distribuir las proteínas sobre el sustrato formando una monocapa

compacta, de manera que el empaquetamiento lateral conceda a las proteínas una mayor estabilidad mecánica ante las fuerzas del barrido de la punta (impidiendo el desplazamiento de los especímenes). De hecho, como se discutirá más adelante, con esta técnica la máxima resolución en muestras biológicas se ha obtenido en cristales bidimensionales de proteínas ($\sim 0.5\text{nm}$) (Müller *et al.* 1997b, Fotiadis *et al.* 2004, Scheuring *et al.* 1999, Seelert *et al.* 2003).

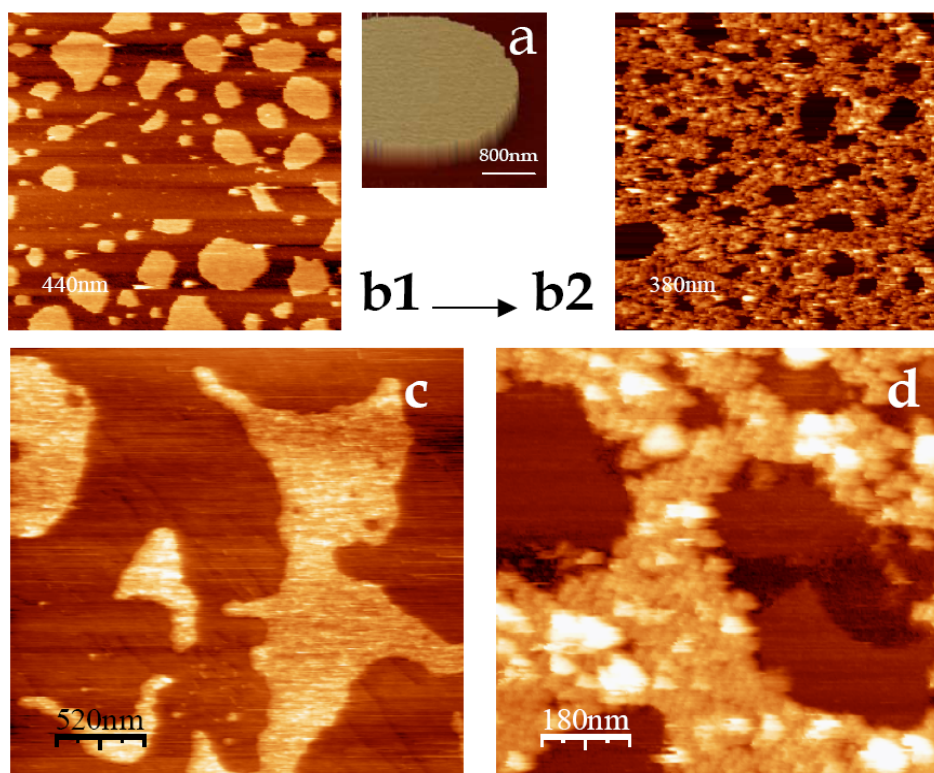


Figura I.19. Confinamiento espacial sobre el empaquetamiento: **a)** Se ha explorado el efecto del confinamiento espacial sobre el empaquetamiento, incubando la proteína sobre un sustrato de mica con islotes de bicapa lipídica (**a**). **b1)** Fragmentos de bicapa lipídica (de fosfatidil glicerol, PG) adsorbidos sobre la superficie de la mica. **b2)** La mayor afinidad del termosoma por la mica provoca su confinamiento en una monocapa adsorbida directamente sobre las zonas desnudas de la mica. **c)** y **d)** Termosoma incubado sobre el sustrato de (**b1**). (La bicapa se formó por incubación sobre la mica de una solución de 0.5mg/ml PG en HEPES 10mM (pH 7.2), 20mM CaCl_2 , 0.1M NaCl durante 4h a T^a ambiente atmósfera húmeda. A continuación la bicapa es lavada con tampón de imagen: Hepes 10mM, pH 7.2, 10mM MgCl_2 . las condiciones de la deposición sucesiva del termosoma coinciden con las optimizadas para la mica no funcionalizada).

La forma más inocua de depositar la muestra sobre la superficie de la mica es por simple interacción electrostática. Jugando con las distribuciones superficiales de carga que ofrece este sustrato (modulables mediante la naturaleza y la concentración de los cationes del medio) se consiguió empaquetar las chaperoninas de una forma cuasi-compacta sobre la mica (**Figura I.18**), y se encontraron condiciones de incubación que inducen la adsorción de las proteínas con dos orientaciones diferentes sobre la mica (**Figura I.20**). La literatura recoge otros esfuerzos realizados para orientar macromoléculas en superficie (Daly *et al.*, 2003; Pallandre *et al.*, 2005).

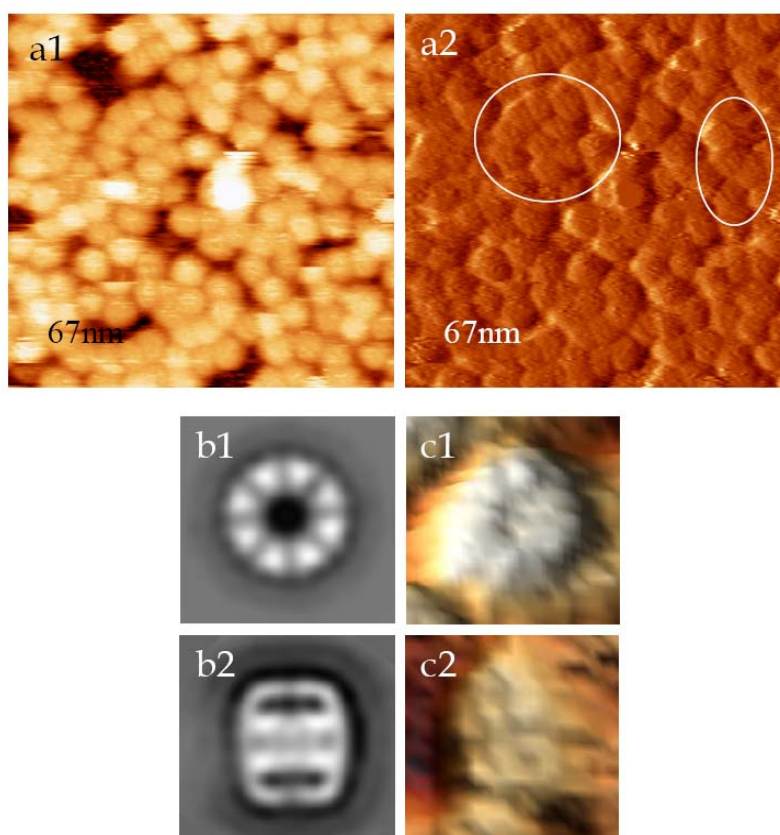


Figura I.20. Orientación sobre la superficie. Vistas laterales y frontales.

Al disminuir la carga superficial de la mica (mediante su recarga con potasio en un paso previo a la incubación de la proteína) se observó un aumento en el número de chaperoninas que se adsorbían “lateralmente”. **a)** muestra de termosoma donde se observan las dos orientaciones, frontal y lateral. En **a2** (la derivada de la imagen topográfica **a1**) se resaltan agrupaciones de vistas laterales. **b)** Promedios bidimensionales de microscopía electrónica de la vista frontal (**b1**) y lateral (**b2**) del termosoma (imágenes facilitadas por Juan Gómez-Reino). **c)** La resolución de las imágenes de topografía es suficiente para diferenciar entre ambas orientaciones.

I.1.4. MOLÉCULAS INDIVIDUALES. Estadística.

Décadas de investigación bioquímica han generado una gran cantidad de información, resultado del estudio promediado de un número enorme de moléculas o eventos (medidas de *bulk* realizadas sobre grandes poblaciones de especímenes). Las microscopías de campo cercano o de sonda, y otras técnicas como la fluorescencia FRET (transferencia resonante de energía por fluorescencia), las pinzas ópticas o las pinzas magnéticas, permiten caracterizar estructural y mecánicamente los especímenes, localizarlos y seguir sus trayectorias *in vivo*, y manipularlos a nivel de moléculas individuales, lo que abre un campo inmensamente amplio e interesante, que verifica y complementa toda la información acumulada por la investigación bioquímica.

En los capítulos de Resultados y Discusión se mostrarán diversas distribuciones construidas a partir de los elementos individuales analizados con AFM y las conclusiones que se pueden extraer de los resultados estadísticos obtenidos a partir de ellas. Sirva como ejemplo la **Figura I.10b.B**, que muestra un promedio realizado sobre partículas ordenadas en un cristal bidimensional. La resolución lateral, ya optimizada por el orden del empaquetamiento (como se discute en el próximo apartado) se mejora hasta 1,2 nm.

I.1.5. ALTA RESOLUCIÓN.

1.5.a. Optimización de la sensibilidad. Cristales bidimensionales.

La sensibilidad de la punta (**Figura I.21b**), el número de puntos registrados por línea (x, z) y de líneas en el eje Y, de píxeles finales de la imagen (de 8, 32, 64, 128, 256 ó 512), y el área total del barrido, definen el tamaño del intervalo más pequeño observable condicionando así la **resolución lateral de la imagen**.

El límite de la **resolución vertical** está determinada por el movimiento vertical del escáner (en general $<1\text{\AA}$), por la sensibilidad del sistema de detección óptico y por el ruido térmico de la micropalanca. El número de puntos muestreados en la dirección vertical, el rango elegido en Z, define igualmente el tamaño del cambio de altura más pequeño resoluble. El ruido del sistema es sin embargo el factor limitante principal, y procede de fuentes mecánicas, eléctricas y acústicas del entorno y del propio microscopio. Buscando optimizar la resolución debemos además minimizar la fuerza, para lo que contamos como variables modulables con: la sensibilidad de la micropalanca (**Figura I.21a**), el modo y los parámetros

de barrido, y el tampón, que define la interacción electrostática entre las superficies de punta y muestra.

El **cálculo de la fuerza realizada** sobre la muestra se saca de la curva F-z registrada sobre un área “dura” (de $k > k_{\text{micropalanca}}$) de la superficie donde se garantiza un régimen lineal tanto a la ida como a la vuelta:

$$[F(\text{nN}) = \text{setpoint} (V) \cdot \text{factor de sensibilidad} (\text{nm}/V) \cdot k (\text{nN}/\text{nm})]$$

donde el factor de sensibilidad (nm/V) viene dado por la pendiente de la curva, y el *setpoint* es la deflexión fijada como origen de voltaje.

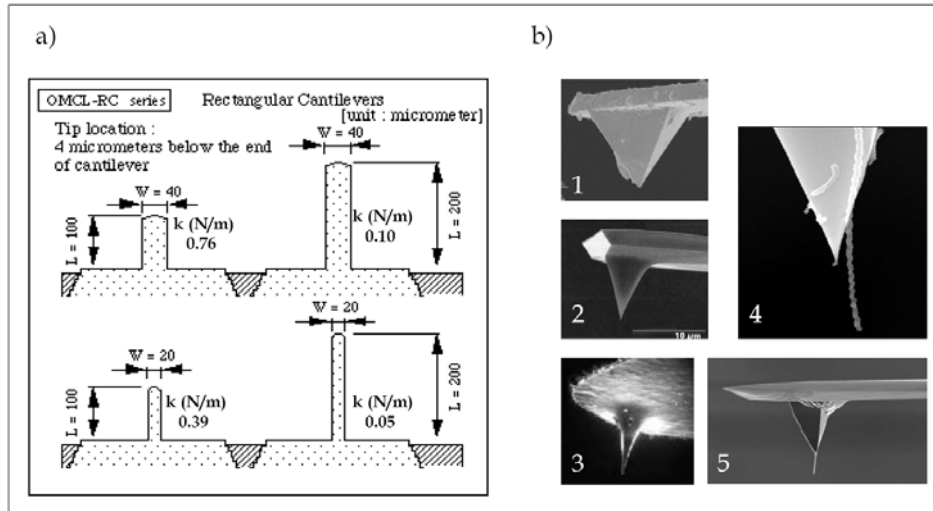


Figura I.21. a) Constante de la micropalanca. Micropalancas empleadas (de la casa Olympus, Japón), de baja constante de fuerza. **b) Poder resolutivo de la punta.** La sensibilidad de la punta depende del radio de curvatura de su extremo y de su capacidad de penetración (definida por los ángulos de las paredes del extremo). La punta deberá ser siempre menor que el objeto que se pretende resolver. De ahí que el desarrollo de las puntas siempre haya buscado hacerlas cada vez más afiladas (1-3) e incluso se hayan colocado en su extremo sondas aún más finas como “nanomuelles” (4) de 20nm de diámetro y 1 μm de longitud (www.innovations-report.de) y nanotubos de carbono, de 1-2 nm de diámetro soldados o crecidos directamente sobre ellas (5).

La fuerza aplicada en medio líquido por una micropalanca de alta sensibilidad (de constantes de fuerza en torno a 0,05-0,76 N/m) queda en la escala de los [pN-nN]. La fuerza más pequeña aplicada en este trabajo fue de 20 pN. Dicha fuerza, aplicada de forma intermitente sobre las chaperoninas resultó ser, sin embargo, excesiva para su caracterización, pues lograba romper la interacción entre los anillos haciendo desaparecer con frecuencia el anillo superior de la estructura (**Figura I.22**) entre dos

barridos consecutivos. Este efecto era mayor sobre las muestras de GroEL y CCT que sobre las de Termosoma (procedente de una arqueobacteria hiperextremófila que crece a 110 °C, y por tanto más resistente). Al añadir nucleótido al medio el efecto de eliminación de un anillo en los tres especímenes aumentaba de forma drástica.

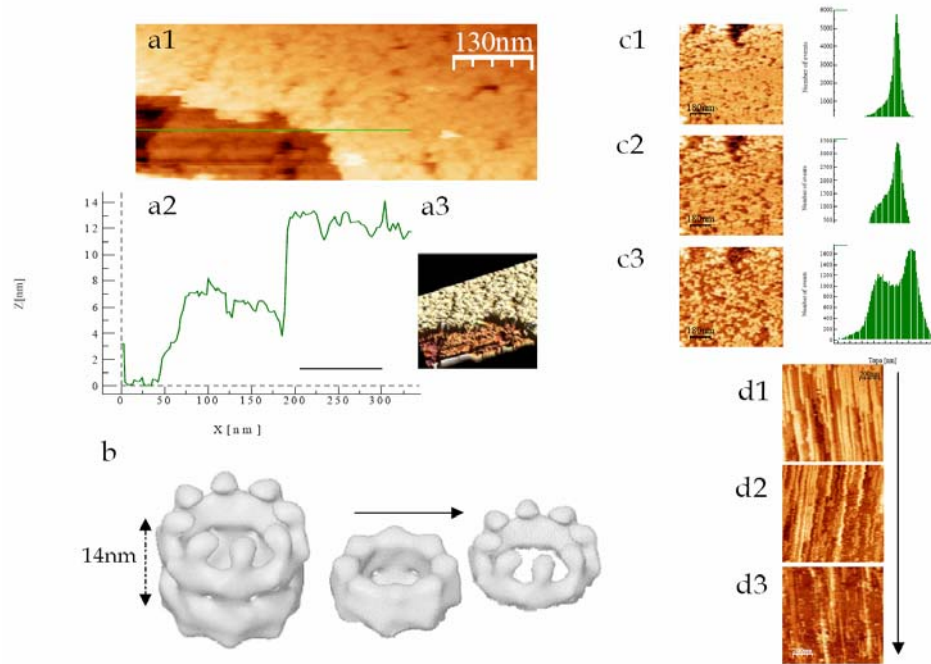


Figura I.22. Resolución topográfica y fuerza. **a)** La interacción entre los dos anillos de GroEL es bastante lábil y el barrido en condiciones de mínima fuerza sobre una muestra de estas chaperoninas empaquetadas lateralmente no siempre previno su “decapitación”, perdiéndose ya en el primer barrido el anillo superior. **b)** Esquema de la “decapitación” de GroEL. **c)** muestra el efecto de sucesivos barridos sobre un mismo área de una muestra de GroEL empaquetada lateralmente. La pérdida del anillo superior se manifiesta en los histogramas de alturas de cada imagen, inicialmente con un sólo máximo a la altura de la GroEL entera (~14nm, ver perfil a2) y más tarde con dos máximos, el segundo correspondiente a la altura del anillo sencillo (~7nm). **d)** muestra cómo se van “decapitando” las moléculas individuales al barrer sucesivamente sobre la misma línea (x, y_0) de la muestra. La flecha corresponde a la evolución del perfil de esta línea imagen a imagen, con lo que representa también la coordenada tiempo. Las moléculas de GroEL que inicialmente están completas van perdiendo primero su anillo superior despegándose después de la mica hasta que ésta queda casi totalmente limpia.

En la **Figura I.18.III** se muestra un estudio en el que se buscaba optimizar el tampón de barrido. Se encontró que una fuerza iónica de 150mM (50mM XCl, 50mM XCl₂) y un pH de 8.0 eran adecuados para la toma de imágenes sobre las muestras de termosoma (resolvían la superficie con mayor nitidez).

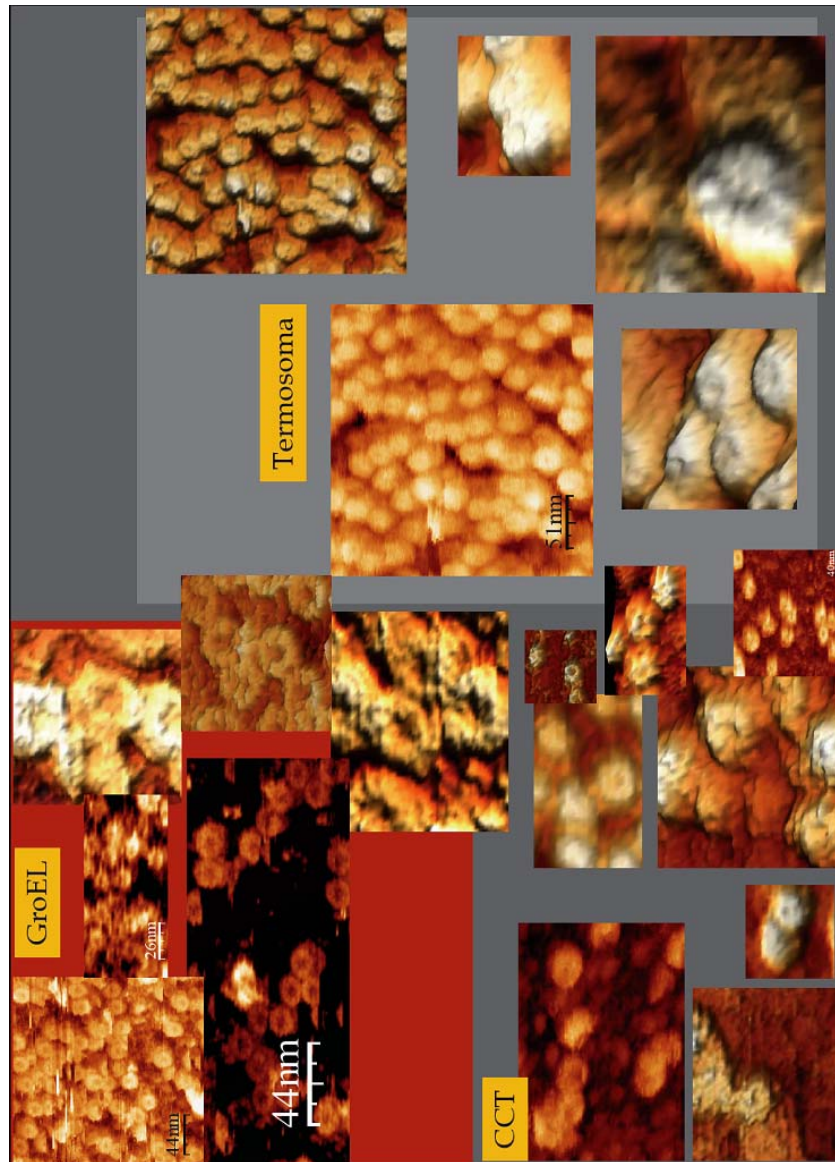


Figura I.23. Imágenes tomadas con las condiciones de barrido encontradas como “óptimas”, a 20-25 pN de fuerza promedio. Se observan especímenes “decapitados” (con un sólo anillo) en las muestras de las tres especies de chaperoninas.

El efecto descrito de “descabezamiento” del doble anillo ha constituido el principal escollo del estudio de estas muestras mediante AFM y el motivo por el que este trabajo no llegó a culminarse. Impedía alcanzar la resolución necesaria para caracterizar los cambios conformacionales, el objetivo del trabajo. En las publicaciones de todos los grupos que hasta ahora habían abordado las chaperoninas (el sistema de GroEL) mediante AFM mencionan este efecto como punto problemático para el que aún no se ha logrado encontrar una solución definitiva (Mou *et al.*, 1996; Viani *et al.*, 2000; Valle *et al.*, 2001; Valle 2003; Yokokawa *et al.*, 2006). La labilidad de la interacción entre los anillos con el paso de la punta tiene como única solución la operación en condiciones de fuerza aún menores.

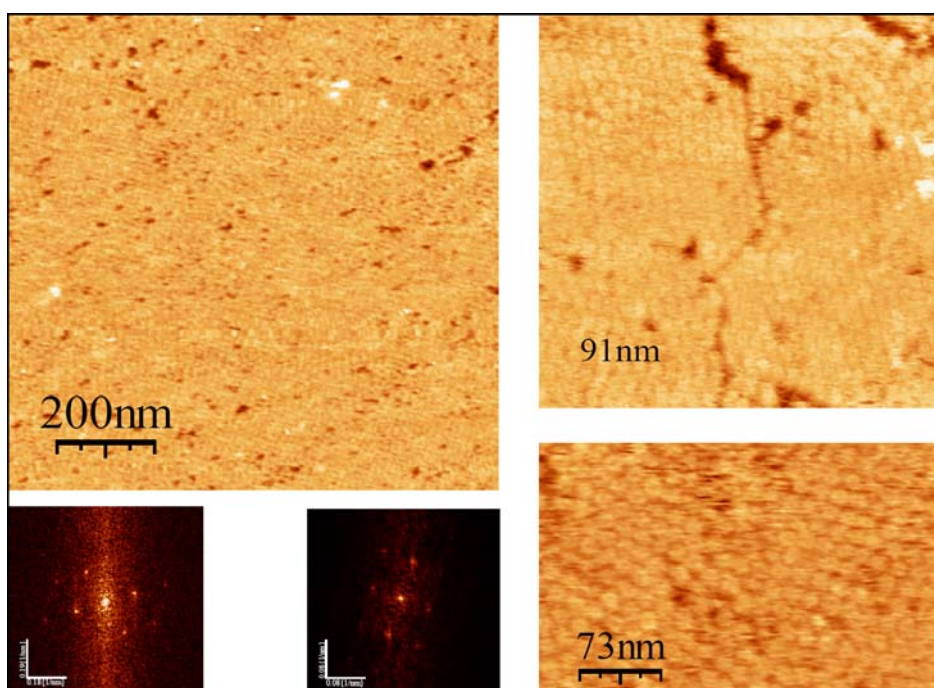


Figura I.24. Cristales bidimensionales. Intento de cristalización de GroEL. Jugando con la fuerza iónica del tampón y con los tiempos y temperatura de incubación se logró un empaquetamiento cuasi-cristalino de GroEL. En las imágenes se observan dominios ordenados cuyas transformadas de Fourier denotan cierto grado de ordenamiento.

Los **cristales bidimensionales**, además de un empaquetamiento lateral compacto, tienen una simetría que permite promediar (lo que mejora la relación señal/ruido) y obtener, gracias al promediado otro tipo de información (Scheuring *et al.* 2007) como mapas de flexibilidad y de hidrofobicidad (de distribución de cargas) de la superficie (Fig. 10). La

dificultad radica en encontrar las condiciones de cristalización. El caso más sencillo lo ofrecen las proteínas de membrana que, una vez unidas a un soporte lipídico, tienden a difundir y a organizarse ordenadamente.

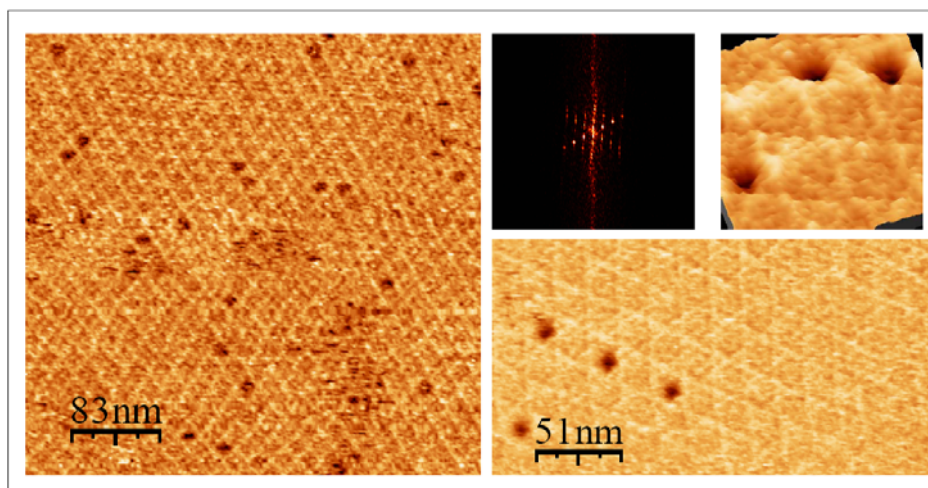


Figura I.25. Cristales bidimensionales de la proteína Annexina V (muestras prestadas por Nikolai Buzinski, del grupo de A. Brisson (Burdeos, Francia). Esta proteína de membrana forma cristales bidimensionales sobre bicapas lipídicas con simetría $p6$ (Reviakine *et al.*, 2000). Las imágenes muestran efectivamente esta simetría y ejemplifican la ganancia en resolución aportada por los cristales 2-D.

1.5.b. Artefactos de las medidas

Además de la aparición mencionada de ruido durante el registro de las imágenes, y del problema ya discutido de la convolución de la punta, existe otro tipo de artefactos típicos introducidos por el piezo o por la punta que paso a describir:

El efecto de **deriva** (*drift*) **del piezoeléctrico** se traduce en imágenes como las de la **Figura I.26a**, donde, bien en la dirección X o en la Y, se producen saltos en el barrido, de forma que los orígenes de dos líneas consecutivas de la imagen están desplazados uno respecto del otro, resultando deformadas las formas de la topografía, alongadas o estrechadas. Se trata de una deriva del *scanner*, en ocasiones debido a una inestabilidad térmica, en otras debido a la aplicación brusca de un *offset*, de un cambio en las coordenadas del centro del área barrida. Dicho cambio de coordenadas lo debe realizar el propio piezoeléctrico, reaccionando a un voltaje externo, y aunque lleva a cabo inicialmente la mayor parte del desplazamiento, el ajuste fino se produce después. Tras un período variable el piezoeléctrico se reestabiliza y

continúa barriendo normalmente. Las imágenes de las **Figuras I.26 b-d** muestran un catálogo de distintos artefactos provocados por la punta.

Se habla de “**efecto punta**” cuando ésta tiene una geometría distinta a la ideal (puntual) sea por desgaste o mala fabricación, sea por tener adherido algún material contaminante. El resultado son imágenes donde todas las rugosidades de la superficie muestran idéntica forma (la de la punta que las perfila) en lugar de su morfología propia (**Figura I.26b**).

Se habla igualmente de “**punta doble o múltiple**” cuando la punta presenta más de una terminación con las que tocar la superficie, generando perfiles múltiples de cada relieve de la superficie. (Ilustro este caso con una imagen de una muestra con DNA, (**Figura I.26c**) donde es claro el efecto de punta múltiple).

Otro artefacto típico es el de **contaminación de la punta** con la propia muestra, generalmente reversible. Alguna molécula de la superficie interacciona lábilmente con la punta y la imagen pierde resolución hasta que se despega la contaminación (**Figura I.26d**) apareciendo líneas y saltos, sea después de varios barridos de la misma área, sea después de hacer oscilar la micropalanca en modo dinámico una vez separada de la superficie.

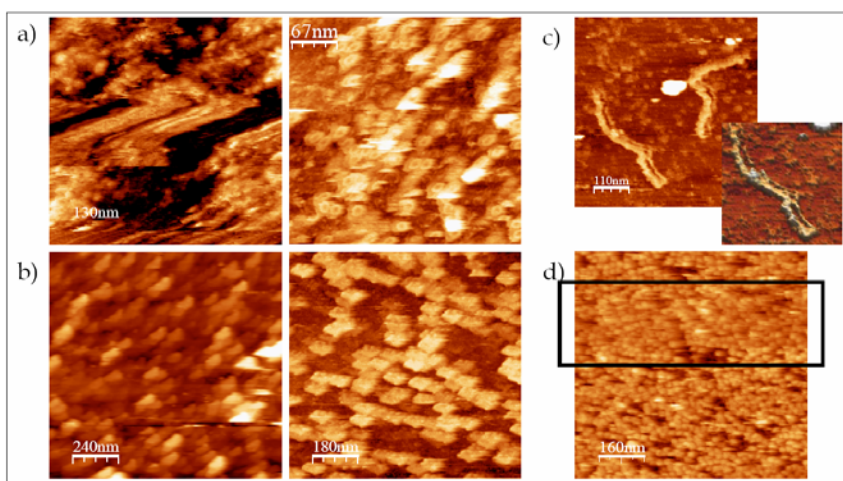


Figura I.26. Artefactos de la imagen

1.6 TÉCNICA DINÁMICA. ESPECTROSCOPIA DE FUERZAS.

1.6.a. Indentación. Nanomanipulación

Las curvas de fuerza ($F-z$) vistas en el epígrafe 1.1.3 se pueden transformar en “**curvas de indentación**” ($F-\Delta z$) que representan la fuerza

requerida para atravesar la muestra a cada distancia Δz de la mica. Esta fuerza está relacionada con la distribución de masa de la muestra.

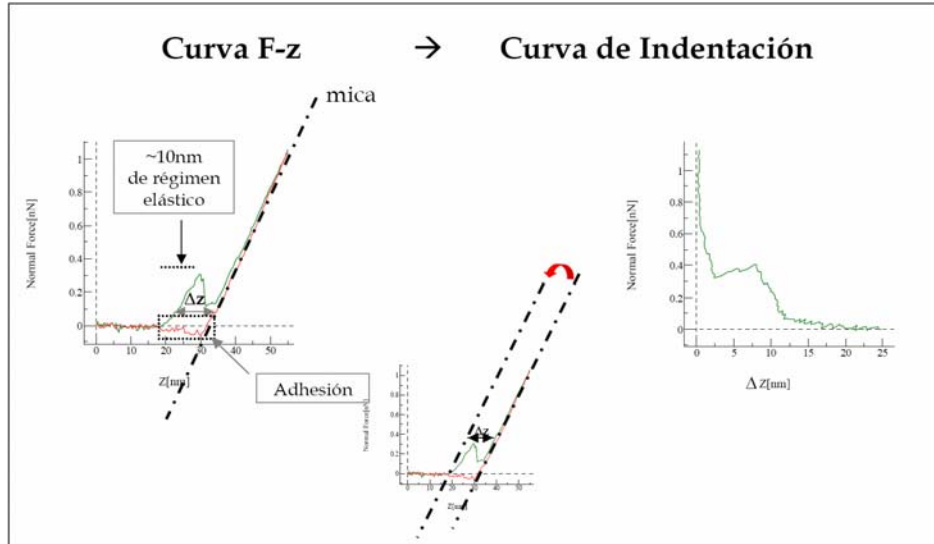


Figura I.27. Definición de la curva de indentación

La indentación " Δz " se calcula como la diferencia de las alturas de muestra y sustrato (en este caso: de la proteína y la mica) a una fuerza dada (**Figura I.27**). La adhesión no nula señalada en la curva de retracción de la F-z indica que aún queda material cuando se retira la punta. El experimento (**Figura I.28**) consiste en seleccionar un espécimen de orientación inequívoca y registrar una F-z sobre él, eliminándolo. De la curva de indentación resultante es posible inferir su distribución de masas y, si se conoce previamente la estructura, deducir o confirmar la orientación sobre el sustrato (**Figura I.29**).

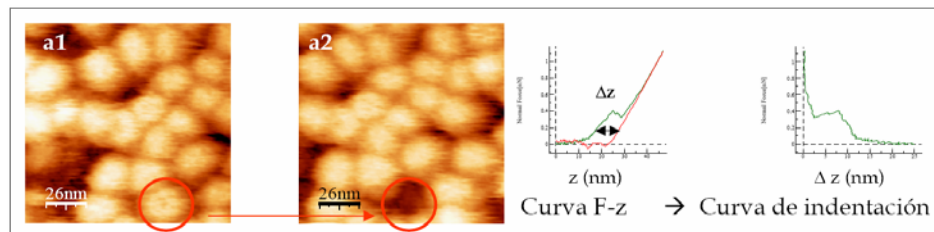


Figura I.28. Se selecciona un espécimen de orientación inequívoca (**a1**) y se registra una F-z sobre él, eliminándola (**a2**). La curva de fuerza se transforma en una "curva de indentación" según la operación descrita en la Figura I.27.

La pendiente de la región lineal de la curva de indentación, señalada como "1" en la figura I.29.c1 y como "2" en la figura I.29.c2,

proporciona el valor de la constante elástica de la muestra, en este caso de la chaperonina por su costado lateral (**c1**) y frontal (**c2**).

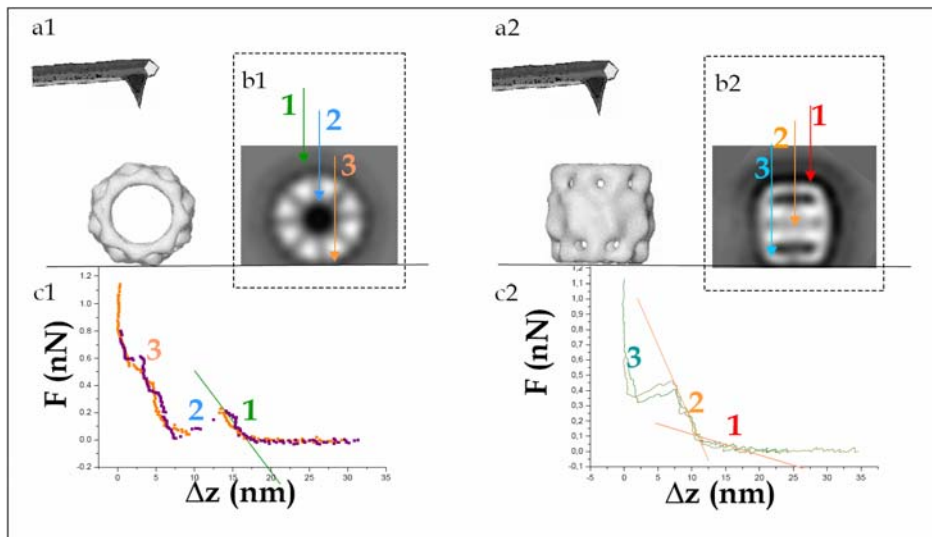


Figura I.29. a) Representación fuera de escala de la punta aproximándose a una chaperonina dispuesta tumbada (**a1**) o verticalmente (**a2**) sobre la mica, lo que dará una vista bidimensional “lateral” o “frontal” como las mostradas en **b2** y **b1** respectivamente. **b)** promediados bidimensionales realizados a partir de micrografías de microscopía electrónica del termosoma. **c)** Las curvas de indentación muestran perfiles distintos y reproducibles para cada orientación, coherentes con la estructura de la chaperonina dispuesta sobre la superficie según una orientación concreta. Los números en **c1** y **c2** indican distintos dominios de la curva, con comportamientos elásticos (1 y 2) o inelástico (3), y las flechas en **b1** y **b2** permiten correlacionar cada régimen distinto con la región indentada correspondiente. Las constantes elásticas de las caras lateral y frontal del termosoma sacadas de la pendiente de esta curva son $\sim 0,11 \pm 0,05$ N/m y $\sim 0,09 \pm 0,01$ N/m respectivamente (N=12).

De la comparación de las curvas de indentación tomadas en muestras distintas pueden inferirse, por ejemplo, cambios conformacionales de la proteína en presencia de nucleótidos (**Figura I. 30a**) o la presencia de un sustrato en la cavidad, reflejados por cambios en el perfil de la curva, cuya pendiente está relacionada con la rigidez del material o con la distribución de su masa.

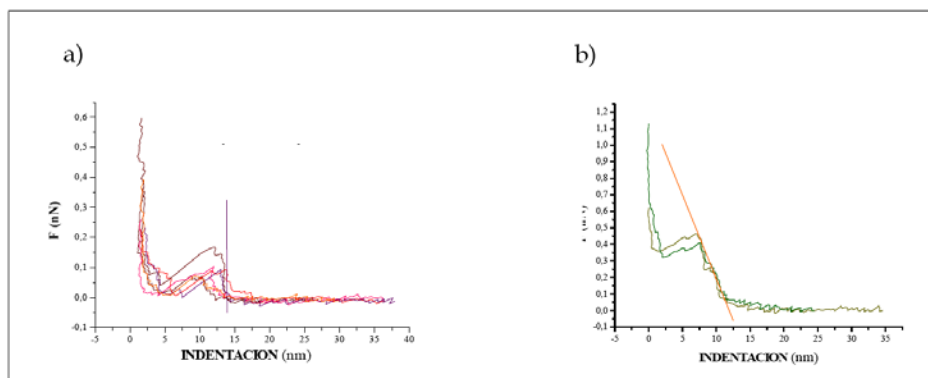


Figura I.30. a) y b) representan curvas de indentación registradas sobre termosomas dispuestos verticalmente sobre la mica (como en el esquema de la **Figura I.29a2**), en presencia y ausencia de nucleótido no hidrolizable (AMP-PNP) respectivamente. Comparando las curvas se observa un cambio sutil en los perfiles (rotura más abrupta en presencia de nucleótido) y en la fuerza necesaria para penetrar la primera masa de la chaperonina, hacia la cavidad central (~ 0.4 nN menor en los termosomas con nucleótido). Esto es coherente con un cambio conformacional, donde las cavidades internas se abren lateralmente y la estructura ofrece una menor resistencia ante la indentación de la punta.

La espectroscopía de fuerzas además de como técnica analítica (Carrasco *et al.* 2008) se ha empleado igualmente como herramienta de manipulación de las muestras diseccionando (“nanodiseccionando”) proteínas o eliminando subunidades concretas (Scheuring *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2006).

1.6.b. Interacciones intra e inter-moleculares.

Existen otras dos aplicaciones de la espectroscopía de fuerzas. La primera estudia las curvas de fuerza de estiramiento de un espécimen que esté anclado tanto al sustrato como a la punta, para resolver la intensidad de las interacciones intramoleculares que sostienen su estructura conforme va siendo desplegado (**Figura I.31a**). La segunda emplea las curvas de fuerza entre dos especímenes, uno depositado sobre el sustrato y el otro sobre la punta, para caracterizar las interacciones intermoleculares entre ellos (**Figura I.31b**) (Willemsen *et al.*, 2000; Kienberger *et al.*, 2000).

Con la primera de estas aplicaciones se ha caracterizado el plegamiento de proteínas con una gran resolución, permitiendo trazar las trayectorias de desplegamiento y re-plegamiento dentro de un mapa de energía de la reacción modelizado (Schwaiger *et al.*, 2005; Janovjak *et al.*,

2004; Carrión-Vázquez *et al.*, 2006). Con la segunda se han logrado estudiar por ejemplo interacciones antígeno-anticuerpo (Hinterdorfer *et al.*, 1998).

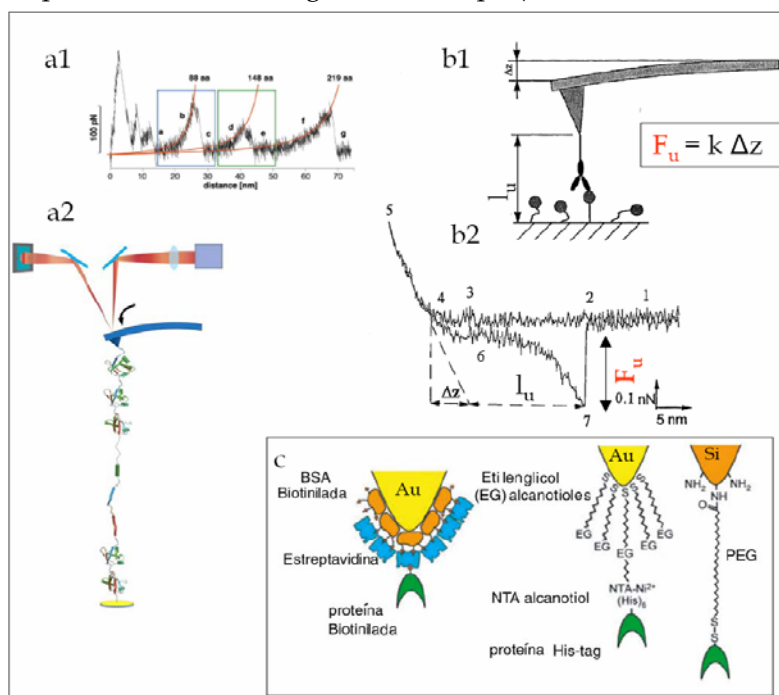


Figura I.31. Espectroscopía de fuerzas. Análisis de interacciones inter e intramoleculares. Esquema extraídos de (Schwaiger *et al.*, 2005) a1), (Brujic *et al.*, 2007) a2) (Hinterdorfer *et al.*, 1998) b) (Hinterdorfer & Dufrêne, 2006) c).

Ambas aplicaciones requieren generalmente la **funcionalización previa de las puntas** y del sustrato, en caso de que se precise una fijación química y no sólo electrostática sobre sus superficies. Existen numerosos protocolos de funcionalización que incluyen una amplísima batería de moléculas orgánicas. En muchos de ellos la punta se recubre con oro para que tenga lugar su unión con el extremo mutado de la proteína que se va a estirar (vía el grupo tiol de una cisteína) o con pequeñas moléculas lineales (que hacen de puente de unión, *linkers*) con un patrón de estiramiento conocido a las que por el otro extremo se unen los especímenes de estudio directamente o mediando entre ellos otros polímeros espaciadores (**Figura I.31c**). Otros grupos reactivos empleados son los amino cuando la punta es de Silicio o de Nitruro de Silicio. En el experimento de análisis dinámico del reconocimiento antígeno-anticuerpo representado en la **Figura I.31b**, la punta se une a un *linker* que a su vez se une a un anticuerpo, que a su vez (al aproximarse el conjunto a la muestra para registrar una curva F-z) encuentra un antígeno sobre la mica con el que interaccionar.

1.7. NUEVAS APLICACIONES DEL AFM. Resolución temporal. Simulación *in vitro* de mecanismos biológicos.

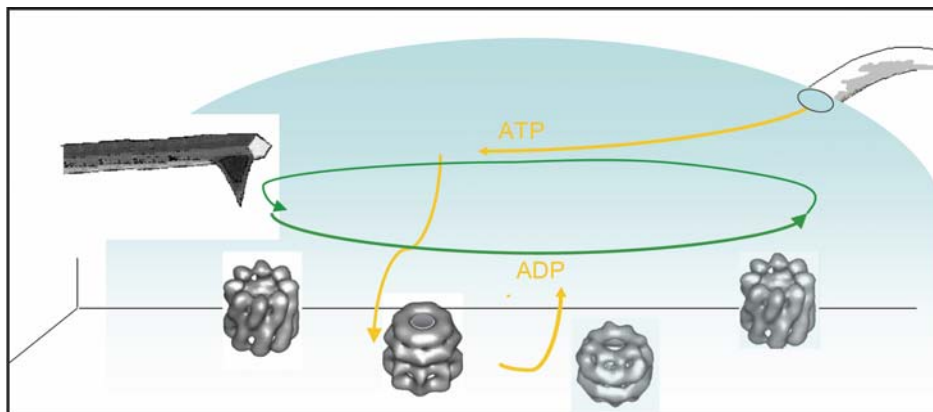


Figura I.32. Reproducción *in situ* del ciclo funcional completo de una chaperonina. Diseño del experimento.

El AFM permite observar *in situ* procesos biológicos que ocurren en una escala de tiempos más lenta que la de la toma de imágenes, puesto que las condiciones casi fisiológicas en las que opera conserva la actividad de las biomoléculas. Si se trata de procesos que implican cambios estructurales éstos deberán ser superiores al límite de la resolución del microscopio ($\sim 1\text{nm}$). Así, por ejemplo, se ha inducido *in vivo* la formación de cilios en células y observado en tiempo real la formación y crecimiento de los axonemas en la membrana celular (Seixas *et al.* 2003), o se han monitorizado en tiempo real la interacción entre antibióticos y membranas (Berquanda *et al.* 2004) y la síntesis y degradación de un polímero proteico, el filamento de FtsZ, en presencia de GTP (Mingorance *et al.* 2005, Hörger *et al.* 2008).

Han proliferado los montajes experimentales que combinan el AFM con la microscopía óptica, de fluorescencia, permitiendo observar un mismo proceso a escalas nano y micrométrica. Por ejemplo recientemente se ha descubierto el mecanismo por el que una bacteria, la *Shewanella oneidensis*, extrae el oxígeno de óxidos metálicos como el Fe_2O_3 (Lower *et al.* 2009). La bacteria expresa citocromos en su membrana exterior de forma que contactan directamente con el óxido. La punta del AFM, funcionalizada con anticuerpos, detectó la aparición de citocromos en la superficie bacteriana mientras que la microscopía óptica determinaba la localización de la bacteria sobre el mineral “nutriente”.

Entre las varias invenciones que han surgido recientemente inspiradas en el AFM quisiera resaltar la SICM (*Scanning Ion Conductance Microscopy*), una microscopía que emplea una nanopipeta como punta (**Figura I.33a**) con la que se puede caracterizar en medio líquido y condiciones muy suaves, de no-contacto, la topografía de la superficie de células vivas alcanzando resoluciones del orden de los nm (**Figuras I.33 d,e**). El circuito de *feedback* que controla la distancia pipeta-muestra se basa en la corriente iónica entre un electrodo situado dentro de la pipeta y otro electrodo en la celda líquida con lo que se pueden inyectar de forma muy controlada soluciones o especímenes con las que manipular o modificar la superficie o inducir cambios en ella (Sánchez *et al.* 2007), y estimular mecánicamente las células y medir las corrientes iónicas generadas intracelularmente o en la membrana (experimentos simultáneos de electrofisiología).

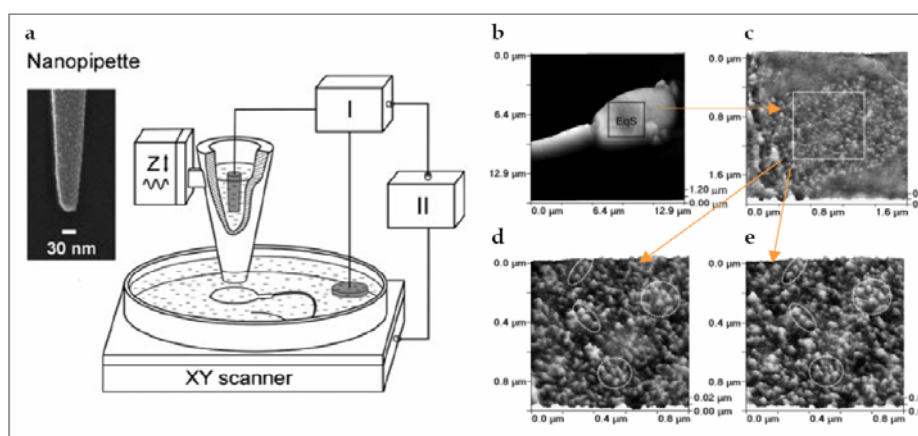


Figura I.33. **a)** esquema del SICM, que cuenta con un amplificador de la corriente iónica (I), un escáner (II), un sistema de piezoeléctricos para mover la nanopipeta sobre la muestra (Z↓), y la propia nanopipeta (en el recuadro) de cuyo radio interno depende la resolución final. **b)** imagen de SICM de un espermatozoide. **c)** imagen de mayor resolución tomada de la región recuadrada en a). **d)** y **e)** son imágenes de la misma región registradas a distintos tiempos donde se observan zonas estables ante los cambios inducidos durante el experimento. (Imágenes extraídas de Shevchuk *et al.* 2006).

Los intentos de aumento de la resolución espacial con nuevas sondas (más penetrantes y de menor radio final) y, sobre todo, de la resolución temporal del microscopio, de la velocidad del barrido, (con *feedbacks* electrónicos más rápidos), están ya generando resultados sorprendentes (Ando *et al.* 2006, Crampton *et al.* 2007) que abren el apasionante campo de la observación en tiempo real de los mecanismos descubiertos y descritos por la Bioquímica.

I.2. La regulación de la transcripción

La **expresión génica** es el proceso por el cual se descodifica la información genética contenida en la secuencia del ADN (transcripción) y se generan las proteínas en ella codificadas (traducción).

La **transcripción** engloba la lectura del ADN y la generación de una copia en ARN (transcrito). Ambas funciones las realiza la proteína **ARN-polimerasa** (ARNp), un motor molecular que reconoce el “promotor”, la secuencia señal que marca el comienzo de la región que va a transcribir (etapa de “preiniciación”). Una vez situada, copiando la cadena molde del ADN, traduce dicha secuencia a ARN-mensajero mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos trifosfato del medio (etapas de “iniciación” y “elongación”), hasta dar con la secuencia terminadora (etapa de “terminación”). La posterior **traducción** del transcrito en forma de proteínas tiene lugar en el **ribosoma**.

La unión de la ARNp al promotor da lugar al denominado “complejo cerrado” (**Figura I.34a**), y éste es seguido por el “complejo abierto” (**Figura I.34b**) en el que la polimerasa cambia de conformación para separar las dos hebras del ADN y permitir así el acceso de los ribonucleótidos y la formación del ARN mensajero. (El calificativo de “cerrado” o “abierto” se refiere al estado de la hélice del ADN).

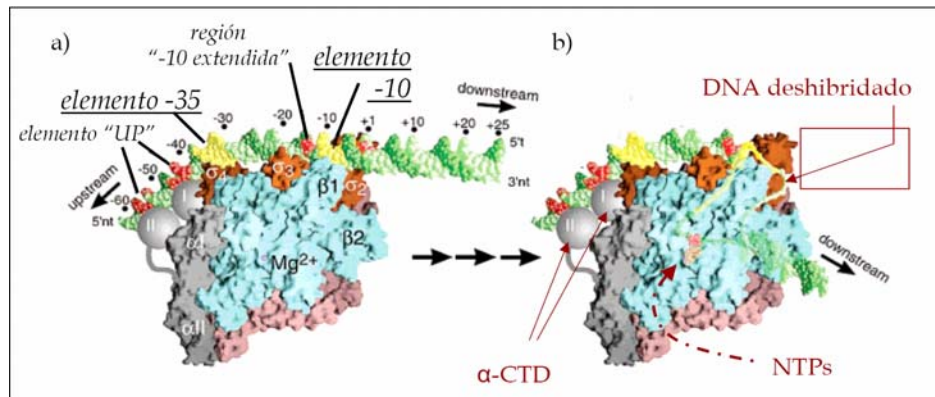


Figura I.34. Modelo de la estructura de los complejos cerrado (a) y abierto (b) formados por la ARN-polimerasa y el ADN (adaptada de Murakami *et al.*, 2002).

2.1. Transcripción en procariotas. La RNA-polimerasa, máquina transcriptora.

Los genomas bacterianos contienen del orden de 4000 genes (y más de 2000 promotores), y cuentan con una compleja maquinaria de regulación de su expresión. La regulación empieza ya a nivel de la propia ARN-polimerasa (**Figura I.34**), pues su estructura cuenta con un multímero invariable (el *core*) y con una subunidad responsable del reconocimiento específico de los promotores, el “factor σ ”, que es intercambiable en función de las necesidades ambientales o del tipo de promotor que va a reconocer (Murakami *et al.*, 2002).

El *core* (~400 KDa) aloja el centro activo donde tiene lugar toda la actividad catalítica. Está compuesto por cinco subunidades (los polipéptidos α , α , β , β' y ω) que conforman los canales por los que pasa el ADN, la cavidad catalítica (en β y β') y que ayudan a anclar el conjunto directamente al ADN o interactuando con proteínas reguladoras unidos a éste. Esta última función la realiza concretamente el dominio C-terminal de la subunidad α (α -CTD), con alta afinidad por las secuencias ricas en A/T que constituyen el “*UP element*”, un elemento extra que contienen algunos promotores y que favorece su reconocimiento, localizado en una región anterior a la transcrita. La estructura de las subunidades α presenta dos dominios unidos por una cadena flexible de ~20 aminoácidos. Un dominio N-terminal (α -NTD) unido al *core* y, en el extremo opuesto, un dominio α -CTD (señalado en la **Figura I.34.b**) diana típica de muchos factores reguladores de la transcripción.

El factor σ reconoce secuencias específicas del promotor y su intervención en la etapa de iniciación de la transcripción es esencial. Constituye además la otra diana importante para los factores de transcripción. La subunidad σ más abundante en la bacteria es la “primaria” o “vegetativa” (σ^{70} en *E. coli*) mientras que las minoritarias son generadas como respuesta a una situación concreta. Están formadas por cuatro dominios de secuencias muy conservadas. Dos de ellos, el σ_2 y el σ_4 , reconocen los dos elementos principales del promotor: los **hexámeros “-10” y “-35”** del ADN (posiciones contadas con respecto al sitio “+1” de inicio de la transcripción). Estos dos elementos, muy bien conservados, son los reconocidos por las subunidades σ vegetativas. Corresponden a las secuencias consenso: $^{-12}\text{TATAAT}^{-7}$ y $^{-35}\text{TTGACA}^{-30}$ respectivamente y se encuentran separados por un óptimo de 17 pb (de secuencia no conservada).

Los otros dos elementos de secuencia identificados como parte del promotor (estos ya no tan conservados) son el ya mencionado “**elemento**

UP'' que reconocen los dominios α -CTD (formado por unas 20 pb situadas entre las posiciones -40 y -60), y la "región -10 extendida" que reconoce el dominio σ_3 y que consiste en un dinucleótido $5'TG^{3'}$ localizado en las posiciones -14 y -15 (Figura I. 34).

La Figura I.35 muestra un esquema simplificado del complejo formado por la ARN-polimerasa y el ADN, en el que se detallan las subunidades α (con sus dominios N y C-terminales), β y β' del *core* y los dominios del factor σ (σ_1 σ_2 σ_3 σ_4) de la polimerasa y los elementos de reconocimiento de un promotor canónico (cajas -10 y -35, dinucleótido TG en la región entre ellas y el "elemento UP").

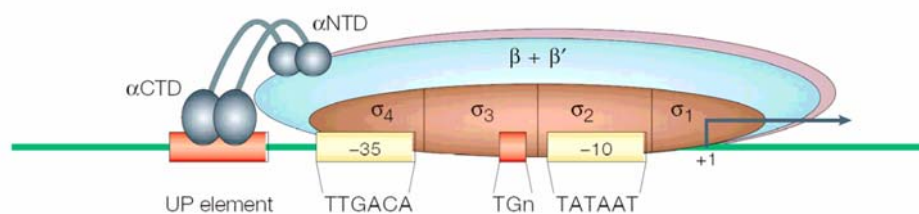


Figura I.35. Esquema simplificado del complejo formado por la ARN-polimerasa y el ADN (Figura tomada de Browning y Busby, 2004).

2.2. Regulación de la transcripción

La regulación de la expresión del material genético de las bacterias es enormemente efectiva: producen la cantidad correcta de proteínas en el momento apropiado. A pesar de que los mecanismos de regulación actúan sobre cada una de las etapas de la transcripción, la gran mayoría lo hacen sobre la etapa de iniciación (de reclutamiento de la polimerasa y formación de los primeros enlaces fosfodiéster), dada la poca disponibilidad en el medio de ARNp libre y la producción limitada de factores σ . Estos mecanismos, y más concretamente aquéllos en los que intervienen los factores de transcripción, son los que se estudian a lo largo de esta tesis.

La **eficiencia de un promotor** depende de cuán parecida sea su secuencia a la secuencia consenso, y esta similitud es ya por sí misma un medio de modulación de la transcripción. Los promotores con secuencias alejadas de la consenso suelen requerir la presencia de activadores que favorecen su reconocimiento, por aumento de la afinidad. Otra forma de

regulación la ofrece la **alternancia entre factores** o distintos de la ARNp, cada uno adaptado a un tipo de promotores. Además, la unión puntual de **pequeños ligandos** a la propia polimerasa puede modular su actividad transcriptora.

Los **factores de transcripción** son proteínas que regulan la transcripción, activándola o reprimiéndola (Browning y Busby, 2004; Rojo, 2001). Puesto que hacen de intermediarios entre la expresión génica y las señales ambientales, su producción o su actividad deben ser asimismo controladas. La modulación de su actividad se realiza por la unión de pequeños ligandos que afectan a su afinidad por el ADN, por modificación covalente, o controlando su concentración local, determinada a su vez por su expresión o por su proteólisis) como es el caso de las proteínas llamadas “nucleoideas” que polimerizan en torno al genoma (como H-NS de *E. coli*). A lo largo de esta tesis se estudian ejemplos de dos de estos mecanismos: regulación por unión de pequeños ligandos, concretamente por unión de tolueno y otros ligandos (el caso del factor TtgV estudiado en el capítulo IV.1), por fosforilación (el caso del factor TodT estudiado en el capítulo IV.2, que es fosforilado por la quinasa TodS), por unión de Benzoil-CoA (el caso del factor BzdR estudiado en el capítulo IV.3), y regulación por control de concentración local (p6 de Ø29, capítulo IV.4).

Ciertos factores de transcripción actúan como activadores y como represores en un mismo organismo, en función del promotor. Un mismo factor de transcripción puede actuar simultáneamente como activador de un promotor y como represor de un segundo promotor contiguo (como es el ejemplo del factor p4, capítulo IV.4). Algunos factores de transcripción son específicos de un promotor concreto, mientras que otros, como por ejemplo los factores Fis, IHF, FNR, CRP de *E. coli*, participan en la regulación de una gran cantidad de genes. Algunos de estos factores intervienen en la compactación de la estructura del ADN, uniéndose de forma inespecífica o en ocasiones con cierta especificidad, y curvando la cadena. Éste es el caso de proteínas nucleoideas como H-NS, Hu, Fis o IHF de *E. coli* (McLeod *et al.*, 2001; Van Noort *et al.*, 2004; Dame, 2005a), y de p6 de Ø29, capítulo IV.4).

En algunos promotores la regulación la lleva a cabo un único factor de transcripción (ejemplo del represor TtgV del capítulo IV.1) que es a su vez modulado directamente por las señales ambientales (en ese caso por la aparición de hidrocarburos aromáticos tóxicos). La regulación en estos casos pasa por la modificación local de la conformación del ADN o por la interacción directa con la RNAP. Las **Figuras I.36** y **I .37** describen los distintos mecanismos por los que un único factor puede ejercer su función activadora o represora.

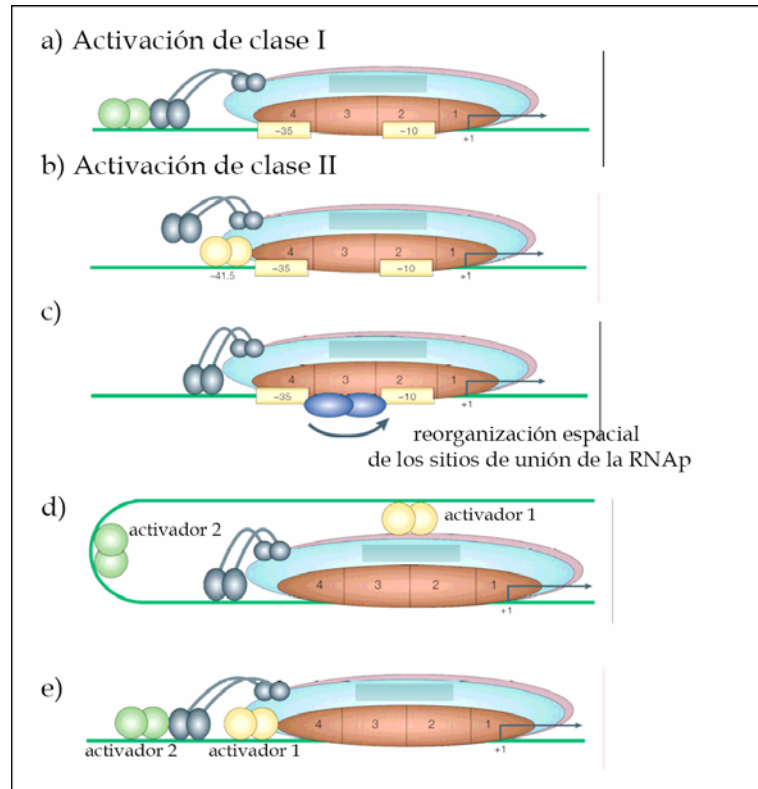


Figura I.36. Mecanismos de activación. Existen tres tipos generales de activación. **a)** En la **activación de Clase I** el activador se sitúa en una región anterior al promotor y recluta o estabiliza a la RNAP vía sus dominios α -CTD (ejemplo de proteínas como Fis de *E. coli*; McLeod *et al.* 2002). **b)** En la **activación de Clase II** el sitio de unión del activador solapa con la caja -35 y estabiliza a la RNAPolimerasa en el promotor por interacción con su dominio σ_4 . Este tipo de activadores suelen aparecer en promotores con una caja -35 de secuencia muy alejada del consenso. (Es el caso del promotor P_N de *Azoarcus* presentado en el apartado 4.1.3, que requiere del activador *AcpR* para su transcripción). **c)** En el tercer tipo de activación el activador induce un cambio conformacional en la estructura del promotor para facilitar su interacción con la RNAP. **d)** y **e)** muestran ejemplos de la actuación simultánea de dos activadores. **d)** muestra cómo un "activador secundario" promueve el contacto de la RNAP con el "activador primario", flexiona el ADN y estabiliza el complejo [RNAP-promotor]. La función que realiza aquí el "activador primario" es característica de factores como Fis, HU o IHF de *E. coli* (McLeod *et al.*, 2002; Kar *et al.* 2001). **e)** muestra un ejemplo de dos activadores actuando conjuntamente para estabilizar el complejo de iniciación, uno de Clase I y el otro de Clase II, ejemplo de los activadores Fis y CRP de *E. coli* en el promotor proP (McLeod *et al.*, 2002) (Figura adaptada de Browning y Busby, 2004).

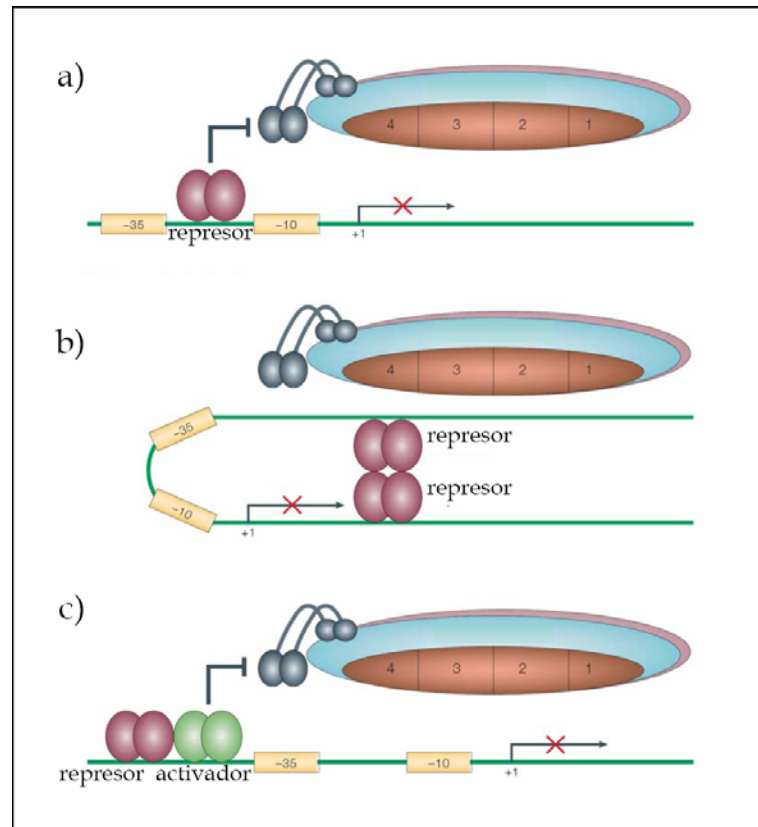


Figura I.37. Mecanismos de represión. Los tres mecanismos generales de actuación de un represor son: **a)** Por impedimento estérico (imposibilitando directamente la unión de la polimerasa al promotor o entorpeciendo la unión, puesto que el sitio de unión del represor está muy próximo o solapa con el promotor). **b)** Encerrando el promotor en una estructura tipo *loop* (ejemplo similar al encontrado en el sistema de $\phi 29$, del capítulo IV.4) o impidiendo que evolucione el complejo de iniciación (ejemplo de la HNS de *E. coli* que hace de puente entre los fragmentos de ADN a ambos lados de la polimerasa, aislándola (Shin *et al.* 2005), por unión múltiple del represor en los extremos del promotor). **c)** anulando la acción del activador (ejemplo de los represores estudiados: TodT de *Pseudomonas putida* (capítulo IV.2) y BzdR de *Azoarcus* (capítulo IV.3), que anulan la activación de IHF y de AcpR respectivamente). (Figura adaptada de Browning y Busby, 2004).

La mayoría de los mecanismos de regulación implican sin embargo la participación combinada de varios factores, independientes entre sí o que por el contrario se unen al ADN de forma cooperativa. Con esta estrategia se alcanzan un grado de sutileza en la respuesta ante una señal

externa y una eficiencia de la regulación mayores. En estos casos el complejo nucleoproteico resultante presenta estructuras tridimensionales más complicadas, por ejemplo: superestructuras de tipo lazo (*loop*) o de tipo horquilla (*hairpin*), indicio de una regulación más compleja, tridimensional. Los capítulos IV.2, IV.3 y IV.4, muestran tres ejemplos de este tipo de sistemas complejos.

2.3. Técnicas empleadas en el estudio de los mecanismos de regulación.

El abordaje del estudio de los mecanismos de regulación transcripcional se lleva a cabo mediante la integración de información dinámica, termodinámica, estructural y funcional proveniente de diversas técnicas bioquímicas y biofísicas (Travers Ed. 2000). Las técnicas habitualmente empleadas son las siguientes:

Técnicas bioquímicas: Ensayos de retardo en gel (EMSA), ensayos de *footprinting* de proteínas en el ADN y ensayos de transcripción.

Técnicas biofísicas: Ultracentrifugación analítica (UCA), Calorimetría isotérmica de valoración o titulación (ITC, *Isothermal titration calorimetry*), y dentro de éstas:

Técnicas estructurales: Microscopía Electrónica, cristalografía de Rayos X, estudios de modelización de la estructura por alineamiento con estructuras de sistemas similares.

Técnicas de moléculas individuales: AFM, técnicas de fluorescencia como la Microscopía de fluorescencia de Reflexión Interna Total (TIRFM) (Gorman *et al.*, 2008) y la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) (Kapanidis *et al.*, 2006), pinzas ópticas y magnéticas (Bai *et al.*, 2006; Herbert *et al.*, 2006).

Modelización teórica: modelos termodinámicos cuantitativos para la predicción estructural del complejo (SantaLucia *et al.*, 2004; Saiz *et al.*, 2006), simulación computacional para el análisis de las secuencias de unión de factores de transcripción (Sarai *et al.*, 2005), etc.

En los capítulos de resultados, y especialmente en el IV.3, sobre el sistema de regulación de la bacteria *Azoarcus* en condiciones anaeróbicas, (en su epígrafe de antecedentes bioquímicos), se presentarán cada uno de los datos estructurales y bioquímicos de partida, especificando la técnica de la que han sido concluidos.

2.4. Aportación del AFM al análisis de los mecanismos de regulación.

Las propiedades funcionales de una molécula están directamente relacionadas con su estructura y afectadas por ella. Así la estructura del ADN y los cambios que sufre por la acción de agentes externos (en este caso por los factores de transcripción) determinan su expresión (Calladine *et al.*, 2004).

La principal ventaja del AFM sobre otras técnicas es, de nuevo, la posibilidad de operar en líquido, permitiendo incluso observar la dinámica de los procesos. Además, llega a detectar proteínas muy pequeñas superando la resolución límite de la microscopía electrónica, y por tanto es clave en la caracterización de complejos nucleoproteicos de tamaño mayor al más grande cristizable y menor que el más pequeño resoluble por ME.

Revisiones como las de Hansma (2001), Rivetti y Guthold (2003) y Dame *et al.* (2003, 2005a), demuestran el creciente empleo del AFM en el campo de la regulación de la transcripción, que genera información que no es sólo de naturaleza estructural.

Por ejemplo, mediante AFM se ha estudiado el reconocimiento de sitios de unión (Yokota *et al.* 1998; Moreno-Herrero *et al.* 2001; Sorel *et al.* 2006), se han determinado constantes de afinidad (Yang *et al.* 2005) y ángulos de flexión inducidos por la ARN-polimerasa en un complejo abierto (Rees *et al.*, 1993) y por los factores de transcripción: Fis (Zhang *et al.* 2004), Hu (Van Noort *et al.* 2004), IHF (Seong *et al.* 2002; Dame *et al.* 2005b) y energías de flexión del ADN (Erie *et al.*, 1994).

Asimismo se ha caracterizado mediante AFM la conformación espacial del ADN inducida por los factores de transcripción LacR (Wong *et al.*, 2008) y H-NS (Dame *et al.*, 2001) o por la ARN-polimerasa en los complejos de transcripción (Rivetti y Guthold *et al.*, 2003). Sobre estos últimos se ha analizado mediante AFM el reconocimiento de los promotores de la ARNp (Cellai *et al.*, 2007), su difusión por el ADN (Guthold *et al.*, 1999), los eventos de colisiones entre polimerasas en transcripción convergente (Crampton *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2005) e incluso se ha observado *in situ* la polimerasa caminando sobre el ADN (Kasas *et al.*, 1997) y transcribiendo el ADN, generando la copia de ARN (Rivetti *et al.*, 2003).

Ascendiendo un escalón en la complejidad se han caracterizado también **complejos ternarios**, formados por un fragmento de ADN y dos factores de transcripción distintos -como son IHF y LacI (Zurla *et al.*, 2007) y GalR y Hu (Lyubchenko *et al.*, 1997)- y formados por un fragmento de ADN, la ARNp y un factor de transcripción, en este caso: H-NS (Shin *et al.*, 2005; Dame *et al.*, 2002), NtrC (Rippe *et al.*, 1997) o Fis (Maurer *et al.*, 2006).

El siguiente escalón, el de los complejos cuaternarios, aún no ha sido superado. En este trabajo se mostrarán los resultados obtenidos de la caracterización de un complejo cuaternario formado por un fragmento de ADN, la ARNp y dos factores de transcripción distintos, las proteínas p4 y p6, del bacteriófago Ø29.

La mayoría de los trabajos citados realizan las medidas en aire, tras depositar las muestras en un sustrato de mica y después eliminar la solución en que estaban disueltas. Esta forma de operar simplifica enormemente las medidas con respecto al trabajo en medio líquido. Reduce la proteína libre que queda sobre la superficie, lo que genera imágenes de resolución igual o mayor que la obtenida en medio líquido (uno de los grandes problemas que afectan al análisis de estas muestras). Sin embargo los resultados estructurales sobre estos complejos pierden relevancia biológica al privarlos del medio fisiológico y siempre habrá que cotejarlos con su correspondiente resultado en medio líquido. En este trabajo se ha optado por realizar la mayor parte de los experimentos en líquido, restringiendo las medidas en aire a un experimento de comprobación (de la estructura de un complejo nucleoproteico regulador de la transcripción del virus Nf) y a la búsqueda de mejor resolución en la caracterización del sistema más complejo estudiado (el complejo nucleoproteico cuaternario de Ø29).

En esta tesis se han estudiado cuatro sistemas distintos presentados por separado en la sección de Resultados. Cada uno de los sistemas estudiados es introducido en su correspondiente capítulo. De cada uno de ellos se presentan y analizan las estructuras encontradas y se proponen modelos funcionales contruidos a partir de dichas estructuras y de todo el cuerpo de datos bioquímicos preexistentes. En el apartado de “discusión” de estos capítulos se tratan las particularidades de la aplicación de la técnica a este tipo de muestras. Así:

En el **capítulo IV.1** se estudia la flexión del ADN realizada por el represor TtgV sobre la región promotora ttgV-ttgG (de *Pseudomonas putida*), y con ella la aportación del AFM de datos cuantitativos al construir estadísticas a partir de datos obtenidos de la caracterización de moléculas individuales.

En el **capítulo IV.2** se estudia la estructura de los complejos formados por el promotor PtodX (de *Pseudomonas putida*) y los factores de transcripción TodT e IHF, y se discuten las estructuras caracterizadas y el papel del represor TodT y del activador IHF.

En el **capítulo IV.3** se estudia la superestructura del complejo nucleoproteico formado por BzdR y el promotor P_N (*Azoarcus*). Se discuten además la enorme complejidad del modelo de regulación y el tipo de información aportada por el AFM al estudio de esta clase de sistemas, como pieza de un “puzzle”, presentándose los resultados de las técnicas bioquímicas y biofísicas a las cuales complementa.

En el **capítulo IV.4** se estudia el sistema principal de este trabajo: la regulación del paso de la transcripción temprana a la transcripción tardía en el bacteriófago Ø29, haciendo uso de todos los conceptos y metodologías de preparación y caracterización de muestra y de análisis de datos referidos en los puntos anteriores.

II. OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general del presente trabajo de tesis es el de caracterizar estructuralmente complejos individuales ADN-proteína de distintos organismos (virales y bacterianos) buscando entender los mecanismos de regulación de la transcripción en los que participan.

Los objetivos específicos son:

- Confirmar mediante una técnica de moléculas individuales, la Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM), los cambios topológicos inducidos por los factores de transcripción en la estructura del ADN sugeridos por resultados bioquímicos y biofísicos previos tanto de sistemas bacterianos como virales.

Sistemas bacterianos :

- Caracterizar las estructuras nucleoproteicas implicadas en la regulación de la transcripción de dos promotores de *Pseudomonas putida*: P_{TtgGHI} y P_{TodX} , regulados respectivamente por el represor TtgV y por los factores transcripcionales TodT (represor) e IHF (activador).
- Caracterizar la estructura de los complejos reguladores de la transcripción del promotor P_N , de *Azoarcus* sp. *CIB*, formados por el represor BzdR y el ADN con la secuencia promotora. Las preguntas principales que se buscaba contestar son la estequiometría del complejo y el papel del efector Bz-CoA en la des-represión del sistema.

Sistemas virales :

- Caracterizar la estructura de los distintos complejos de regulación implicados en el mecanismo que organiza temporalmente la expresión del genoma de los bacteriófagos Ø29 y Nφ que determina la transición entre la transcripción de los genes tempranos y la de los tardíos.
- Establecer relaciones y similitudes entre los mecanismos de regulación de la transcripción génica de estos cinco sistemas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.0. Visualización de ADN mediante AFM

La preparación de muestras para la Microscopía de Fuerzas exige un paso de adsorción de la muestra sobre una superficie, es decir: una transferencia de estructuras del espacio tridimensional al bidimensional, que puede alterar la configuración del ADN o la de sus complejos con proteínas. Estudios teóricos del proceso de deposición (basados en modelos termodinámico-estadísticos empleados en el área de polímeros como el *worm like chain model*) han demostrado que la restricción de grados de libertad no afecta a la estructura siempre que las condiciones de adsorción garanticen que la muestra se pueda equilibrar en la superficie, esto es: permitiéndole que explore, por difusión, entre las configuraciones accesibles para alcanzar la de equilibrio (Kasas *et al.*, 1997; Rivetti *et al.*, 1998). Los cationes divalentes o polivalentes son los encargados de “mediar” entre las cadenas negativas del ADN y la superficie, igualmente negativa, de la mica, favoreciendo una adsorción más o menos firme en función de la concentración superficial de cationes polivalentes (*i.e.* en función de la proporción de huecos negativos de la mica ocupados por dichos cationes, y por tanto positivos). Sobre este aspecto se han realizado muchos estudios (Hansma *et al.*, 1997; Pastré *et al.*, 2003, 2006; Piétrement *et al.*, 2003; Valdrè *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). El anclaje del ADN a la mica tiene lugar por tanto a lo largo de toda su longitud, lo que minimiza su posible desplazamiento con el barrido y garantiza una resolución “óptima”, solo limitada lateralmente por el diámetro de la punta. (De hecho, la propia visualización del DNA puede servir para calibrar el diámetro de la punta, relacionado con la convolución lateral.

En las condiciones experimentales de este trabajo (5-20mM de MgCl_2 o 5-10 mM de NiCl_2) se ha observado difusión en superficie tanto de las moléculas de ADN como de sus complejos con proteína. Las cadenas de ADN presentan mayor movilidad que la proteína, que queda más “anclada” a la mica), confirmándose la fiabilidad de los datos cuantitativos que se obtengan (distribuciones angulares, etc.).

Las medidas en estas muestras se han realizado en medio líquido en casi todos los experimentos, en contraste con los trabajos publicados que son, generalmente, en aire. A pesar de que trabajar en líquidos es técnicamente más complicado, de esta forma se caracteriza la muestra en un medio más próximo al fisiológico y se evitan las potenciales desviaciones de las configuraciones de equilibrio que pueda introducir la etapa de secado implícita en la operación en aire (a través de la gran tensión superficial asociada al proceso de deshidratación).

III.1. Purificación del material biológico utilizado.

Se detalla a continuación la metodología empleada en la producción y la purificación de los fragmentos de ADN de Phi29. El resto de muestras biológicas analizadas en esta tesis han sido proporcionadas por los laboratorios colaboradores, y han sido purificadas como explicado en las publicaciones Guazzaroni *et al.*, 2007a; Lacal *et al.*, 2008a; Durante-Rodríguez *et al.*, 2008.

Los fragmentos se obtuvieron por amplificación por PCR empleando la ADN-polimerasa “Pfu” (Promega) a partir del propio genoma del bacteriófago como ADN molde, y los oligonucleótidos (Isogen Life Science):

·4699 (5'-CTACAGGTAGCTCATAAACCTCTGTGTTAGGTTCAAC-3') y

·5888 (5'-CCTCAGCATCGTACTGTTTTCTTTGTGATGTCGTATAAATCTCTTC-3')

como cebadores. Este último oligonucleótido, biotinilado en su extremo 3', fue el empleado en la obtención de ADN marcado con biotina para ensayos ulteriores.

Los productos de la PCR se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa (NuSieve® GTG) y fueron extraídos por un kit de Qiagen Qiaquick® “Gel Extraction”. El ADN recuperado por ambos procedimientos se llevó a una concentración de 50 ng/μl. El ADN biotinilado se purificó en una columna miniQ de intercambio aniónico usando un sistema de cromatografía SMART (GE Healthcare) y unido a estreptavidina en una relación 1:100. La estreptavidina libre se eliminó mediante un tamiz molecular (una microcolumna Superosa 6 PC 3.2/30).

III.2. Formación y purificación de complejos nucleoproteicos.

Los complejos caracterizados se incubaron a distintas relaciones proteína/ADN, como se especifica en el punto III.4. En aquellos casos en los que se usaron altas relaciones [proteína-ADN] para generar el complejo se necesitó un paso adicional de purificación de los complejos ya formados, para eliminar el excedente de proteína libre.

III.3. Preparación de muestra para su análisis por AFM

Los complejos formados se depositaron sobre una superficie de mica recién exfoliada (Agar Scientific Limited) sin un tratamiento intermedio de la superficie con especies que la modifican químicamente. Se optimizaron la concentración de la muestra (~1,2 nM), el tampón y el tiempo de adsorción para cada sistema de forma que la concentración final de material incubado sobre la superficie sea tal que la proteína en exceso no unida al ADN y sí adsorbida en la mica no perturbe el proceso de toma de imagen. En las muestras destinadas a medidas **en líquido**, a continuación se realizaron sucesivos pasos de lavado con el tampón de imagen y se procedió a la medida.

Las muestras observadas **en aire** (sólo estudiadas en el sistema de Phi29) se prepararon según un protocolo distinto (Révet *et al.*, 1998; Pastré *et al.*, 2006). Una vez incubadas las muestras en el tampón con los cationes divalentes magnesio o níquel, o el trivalente: espermidina, la superficie fue tratada con acetato de uranilo muy diluido (0,02%) y, después de un minuto de espera, lavada con agua MilliQ (Millipore) y secada mediante papel de filtro. El acetato de uranilo se emplea en microscopía electrónica como agente de tinción (en porcentaje muy superior). Los cationes pesados UO_2^{2+} desvían el haz electrónico y aumentan el contraste de la micrografía. En este caso el papel del acetato de uranilo es el de extender las cadenas sobre la superficie (como descrito en Révet *et al.*, 1998).

Las condiciones concretas de incubación sobre la mica de cada sistema se detallan en el siguiente apartado: III.4.

III.4. Formación de los complejos y preparación de la muestra de AFM específicas de cada sistema

A continuación se especifican las condiciones de formación de los complejos de cada sistema estudiado y los procedimientos adicionales de purificación de los mismos (si empleados) así como las condiciones de incubación sobre la mica:

1) TtgV

Los complejos se incubaron en una relación ADN/proteína variable (1:5 - 1:8) a temperatura ambiente durante 10 minutos en el tampón: 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 mM acetato magnésico, 10 mM KCl, 3.3% (w/v) PEG, 1 mM DTT, óptimo para la formación de complejos específicos. (El ADN diseñado para estos experimentos se representa en la Figura IV.4)

A continuación se diluyó la muestra en el tampón: [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM MgCl_2 , 10 mM KCl] hasta una concentración final de ADN de 3nM y se depositó sobre la superficie de un sustrato de mica recién exfoliada

durante 1 minuto, antes de lavar y proceder a la toma de imagen en el mismo tampón [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 10 mM KCl].

2) TodT

Los complejos binarios se formaron por incubación de las proteínas TodT, C-TodT o IHF (previamente tratadas con DTT) con una solución 25nM del fragmento de ADN diseñado para estos experimentos (**Figura IV.9b**) en el tampón: 43 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10% glicerol, pH 6.8, a Temperatura ambiente durante 30 minutos. Las relaciones molares proteína:ADN oscilaron entre 30:1 y 70:1.

En la formación de los complejos ternarios TodT-IHF-ADN se usaron concentraciones iguales de ambas proteínas y relaciones ADN:proteínas similares a las de los complejos binarios, y condiciones de incubación idénticas de: tiempo, temperatura y tampón de incubación.

La incubación sobre la mica se realizó en presencia de 5mM de NiCl₂, habiendo diluido la mezcla previamente en el mismo tampón a una concentración de ADN 2,5 nM. A continuación se lavó abundantemente la muestra y se procedió a la toma de imágenes en medio líquido.

3) BzdR

Los complejos con cada una de las cuatro sondas empleadas (descritas en la **Figura IV. 26**) se formaron a Temperatura ambiente, durante 15 minutos, en tampón T (10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA). La incubación de los complejos se realizó a una concentración final de ADN 2nM y a una relación ADN:BzdR entre 1:28 y 1:70 (partiendo de *stocks* de proteína purificada de 100 nM), condiciones que minimizaban la concentración de proteína libre en superficie. Estas relaciones corresponden a los complejos de los carriles 2-4 de los retardos mostrados en la **Figura IV. 23b**. Con lo que según estos experimentos la población de “complejo 2” (y de complejo en general) estará pobremente representada (el carril 7 en el que sólo se da “complejo 2” corresponde a una relación 1:2000).

En presencia de Mg²⁺ (hasta al menos 50mM), no se habían registrado cambios en la afinidad entre BzdR y el ADN. Éste fue el catión divalente empleado en la preparación de las muestras de AFM, junto con el Ni²⁺, para dirigir la adsorción de los complejos sobre la mica. Las muestras de complejos se diluyeron 10 veces en el tampón de adsorción, “tampón T”, en presencia de MgCl₂ o NiCl₂ entre 3-10mM. Tras 1 minuto de incubación sobre la mica se eliminó el material no adsorbido con sucesivos lavados con el mismo tampón de adsorción y se procedió a la toma de imagen.

4) Phi29

Los complejos se formaron por incubación de p4, p6 y ARNp con los fragmentos de ADN a distintas relaciones ADN:proteína. ([ADN:p4] entre 1:12 y 1:40, [ADN:p6] entre 1:16 y 1:58, [ADN_C-p6] entre 1:50-1:250, [ADN:ARNp] entre 1:5 y 1:10, [ADN:p4:p6] entre 1:12:20 y 1:30:60, [ADN:p4:p6:ARNp] entre 1:10:30:3 y 1:40:80:6, [ADN_{NE}:p4_N:p6_N] entre 1:14:28 y 1:56:80) en el tampón de unión: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, durante 10 minutos a 0°C.

El fragmento de ADN empleado, de 1189pb, con la secuencia de los promotores A2b, A2c y A3 está representado en la Figura IV.38b. El fragmento de 1914pb situaba el promotor C2 en un extremo.

En el caso de los complejos [ADN_C-p6] se necesitó un paso adicional de purificación, para eliminar el excedente de proteína libre una vez formados los complejos, empleándose para ello una microcolumna Superosa 6 PC 3.2/30. El protocolo de fijación con glutaraldehído (al 0,1%-1%) que se siguió a continuación en algunas de estas muestras se recoge en la referencia: Dodson y Echols, 1991.

A continuación se depositaron sobre la superficie de mica recién exfoliada durante 1-2 minutos, diluyéndolos hasta una concentración final de ADN de ~1,2nM en un tampón similar al de unión con concentración y naturaleza variable de catión divalente (5-15 mM de MgCl₂ o de NiCl₂).

Las muestras estudiadas en líquido se lavaron después con el tampón de toma de imagen (idéntico al empleado para diluir los complejos en cada caso: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 5-15 mM MgCl₂ o NiCl₂).

Las muestras estudiadas en aire se prepararon según un protocolo distinto descrito en el capítulo III de Materiales y Métodos: los complejos formados se diluyeron en el tampón: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5-15 mM MgCl₂ o NiCl₂ o 50 μM de SpdCl₃ (cloruro de espermidina, para favorecer su adsorción sobre la mica); la superficie ya incubada se trató con una solución de 0,02% de acetato de uranilo durante 1minuto y a continuación fueron lavadas con agua Millipore y secadas con papel de filtro.

III.5. AFM. Toma de imágenes

La toma de imágenes en líquido se realizó con un Microscopio de Fuerzas Atómicas de Nanotec Electrónica (S.L.), con una celda líquida como la esquematizada en la **Figura I.14** de la Introducción, con el *scanner* más pequeño (con un área máxima de barrido de (10x10) μm² y un rango máximo en el eje Z de 2 μm), operando predominantemente en modo de contacto intermitente (*jumping mode*) y usando micropalancas de nitruro de silicio con constante de fuerza dentro del intervalo {0.76-0.05} N/m, con puntas de radio ~20 nm (Olympus OMCL-RC800PSA).

La toma de imágenes en aire se realizó con un Microscopio de Fuerzas Atómicas “Nanoscope IIIa” (Veeco, Santa Barbara, CA) operando en modo de no contacto (*tapping mode*), y empleando micropalancas de silicio con constantes de fuerza comprendidas entre 36 y 67 N/m (Olympus AC160TS).

Las imágenes de AFM mostradas en los capítulos que siguen fueron tomadas en líquido si no se indica lo contrario.

III.6. Tratamiento y análisis de imágenes

El procesamiento de las imágenes y el análisis de las mismas se ha realizado con el software “WSxM” desarrollado por Nanotec Electrónica S.L, (Horcas *et al.*, 2007).

Para el análisis de ángulos se ha empleado el software ImageJ (NIH).

IV. RESULTADOS

IV.1. Regulación de la transcripción en *Pseudomonas putida*.

Papel del represor TtgV

IV.1.1. Introducción

Los disolventes orgánicos (y entre ellos los hidrocarburos aromáticos, alcoholes alifáticos, etc.) son sustancias tóxicas para toda célula por dañar irreversiblemente la membrana citoplasmática. Sin embargo la bacteria extremófila *Pseudomonas putida* DOT-T1E sobrevive en ambientes con concentraciones de hasta un 90% en este tipo de sustancias (xilenos, tolueno, estireno, etc.), e incluso es capaz de crecer a partir de ellas, empleándolas como fuente de carbono y de energía. A partir de una cierta concentración umbral de las mismas, la bacteria activa un mecanismo de expulsión por bombeo para eliminar su exceso. En este organismo se han identificado tres bombas distintas del tipo “mdr” (*multiple drug resistance*), responsables típicas de la resistencia ante antibióticos, flavonoides, disolventes orgánicos y medicamentos, en organismos procariotas y eucariotas. Las tres bombas son: TtgABC, TtgDEF y TtgGHI, siendo esta última la expresada a nivel basal y la pieza clave de la tolerancia de la bacteria ante los disolventes orgánicos.

Las proteínas de membrana TtgG (proteína de fusión periplasmática), TtgH (translocasa) y TtgI (factor de membrana externa) que forman la bomba están codificadas por el operón TtgGHI y se transcribe a partir de un único **promotor**, el P_{TtgGHI} . La expresión de la bomba es inducida por los propios disolventes orgánicos. Las dos cajas -10 y -35 de reconocimiento de la ARN-polimerasa (**Figura IV.1**) presentan secuencias muy cercanas a las consenso para el factor σ vegetativo de la ARNp (véase la **Figura I.35**).

Se ha descrito que la **proteína TtgV** actúa como regulador específico de la bomba TtgGHI, concretamente como represor (Guazzaroni *et al.* 2004). Así, TtgV, en forma de tetrámero, interacciona con dos secuencias repetidas invertidas de la región promotora P_{TtgGHI} (**Figura IV.2**) con una gran afinidad ($k_D = 50$ nM), cubriendo 42 pb que incluyen ambas

cajas -10 y -35 (Rojas *et al.* 2003; Guazzaroni *et al.* 2004, 2007a). Asimismo se ha descrito que el tetrámero se despega del ADN en presencia de sus efectores: los propios disolventes orgánicos (compuestos aromáticos de uno o dos anillos y alcoholes alifáticos), permitiéndose entonces la transcripción de los genes estructurales de la bomba (Guazzaroni *et al.* 2005, 2007b).

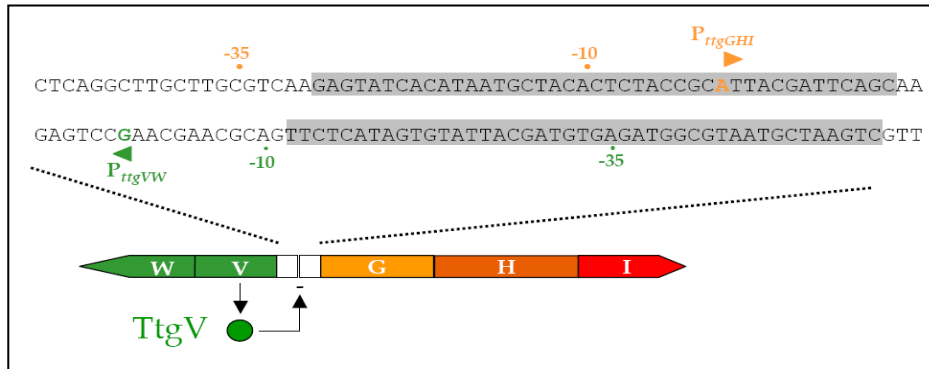


Figura IV.1. El sitio de unión del represor TtgV (sombreado en gris) está situado en la región intergénica entre el operón de los genes de la bomba de extrusión de disolventes (en naranja), y el operón que contiene el gen del propio regulador (en verde). Los promotores de dichos operones P_{TtgGHI} y P_{TtgVW} solapan entre sí y con la región ocupada por TtgV.

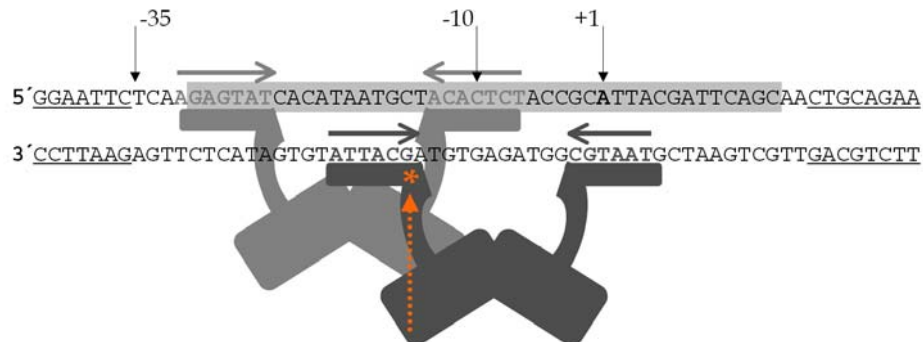


Figura IV.2. Hipótesis de unión de TtgV a su operador. Las flechas convergentes indican las secuencias repetidas invertidas reconocidas por TtgV. El asterisco indica la posición de la hipersensibilidad encontrada en los experimentos de protección contra metilación por dimetilsulfato, la Guanina de la posición -14 respecto del inicio (+1) de la transcripción del promotor P_{TtgGHI} .

El gen que codifica a la propia TtgV se transcribe en sentido opuesto desde el operón *ttgGHI* y los promotores correspondientes: P_{TtgVW} y P_{TtgGHI} solapan entre sí, de forma que el sitio de unión de TtgV cubre las cajas -10 y -35 del P_{TtgGHI} y la caja -10 de P_{TtgVW} (**Figura IV.1**).

TtgV pertenece a una familia de reguladores transcripcionales, la “IcIR”, formada por al menos 500 proteínas que participan en la regulación de una gran variedad de procesos metabólicos tanto en bacterias como en arqueas. Todas ellas tienen en común un motivo estructural de unión al ADN (un dominio HTH, *helix-turn-helix*, en el extremo N-terminal señalado en la **Figura IV.3**) y un dominio de unión al efector (Krell *et al.*, 2006). La única estructura completa de un regulador de esta familia conocida hasta el momento es la del: TM-IcIR de *Thermotoga maritima*, representada en la **Figura IV.3a** (Zhang *et al.*, 2002). Para la mayoría de estos sistemas, sin embargo, aún se desconocen el mecanismo molecular de reconocimiento del efector, la secuencia consenso del sitio de unión al ADN y la conformación del ADN en el complejo.

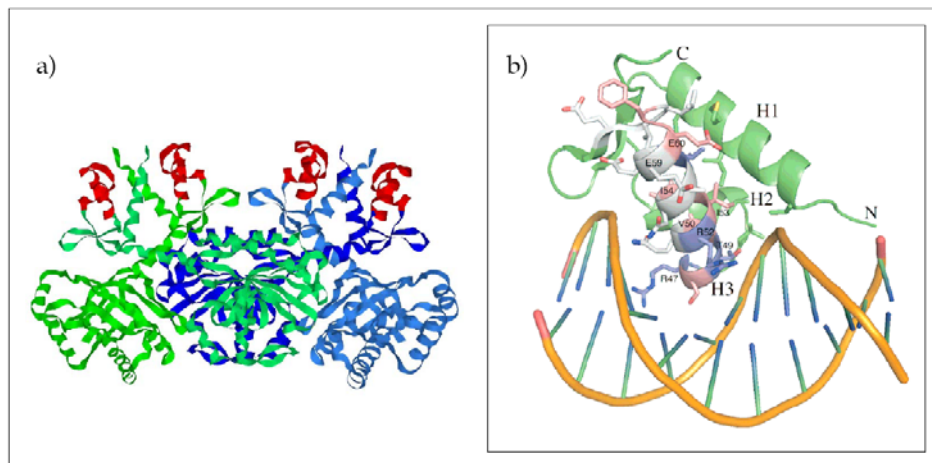


Figura IV.3. **a)** Estructura cristalina del tetrámero formado por el regulador IlcR de *Thermotoga maritima* (pdb: 1MKM), otro miembro de la familia IcIR a la cual pertenece TtgV. Los cuatro dominios de unión al ADN del tipo “HTH” están indicados en rojo. (Zhang *et al.*, 2002). **b)** Representación de la interacción entre el dominio HTH de TtgV y el ADN, que tiene lugar entre una de las dos hélices del dominio HTH y el surco mayor del ADN (modelo extraído de Fillet *et al.*, 2009).

La información sobre TtgV previa a este trabajo comprendía un modelo del bolsillo de unión de los efectores (Guazzaroni *et al.*, 2007b), un modelo de la unión de su dominio HTH al ADN (**Figura IV.3b**) y la

secuencia de su sitio de unión al ADN (**Figura IV.2**). Quedaba conocer la estructura del complejo TtgV-ADN para determinar el mecanismo concreto de la represión. Los experimentos de dicroísmo circular revelaron que TtgV distorsiona la estructura del ADN y apuntaban a que induce una torsión. Los ensayos de *footprinting* de protección contra metilación por dimetilsulfato (DMS) mostraron una hipermetilación en la guanina señalada en la **Figura IV. 2** (en la posición -14 respecto del inicio de la transcripción del promotor P_{TtgGHI}) lo que puede ser indicio de una flexión (Guazzaroni *et al.*, 2004). A continuación se presentan los resultados de la caracterización mediante AFM de la estructura de este complejo.

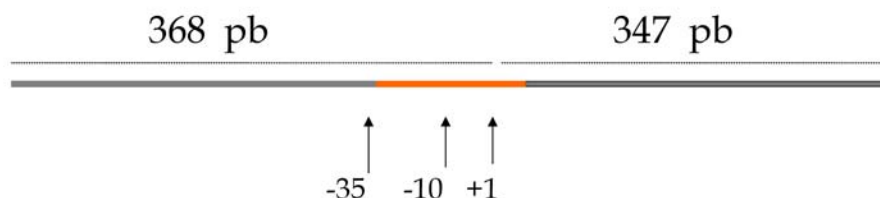


Figura IV. 4. Fragmento obtenido por PCR del genoma de *Pseudomonas* empleado en los experimentos de AFM. Consta de 716 pb (257 nm) de los nucleótidos -368 al +347 respecto del sitio +1 del P_{TtgGHI} , que sitúa el sitio de unión de TtgV a un 43% de la longitud total con respecto al extremo más cercano y que se obtuvo por PCR (Guazzaroni *et al.*, 2007a).

Las condiciones utilizadas en la formación de los complejos y de preparación de las muestras de AFM se especifican en los apartados III.3 y III.4.A del capítulo III de Materiales y Métodos.

IV.1.2. Resultados

Los resultados de la caracterización estructural del complejo TtgV-ADN mediante AFM confirmaron la flexión sugerida por los datos previos aportados por dicroísmo circular. TtgV induce un ángulo convexo en su sitio de unión como muestran las imágenes **b**, **c** y **d** de la **Figura IV.5**. Dada la homogeneidad en la estructura de los complejos se procedió a la determinación de dicho ángulo. Para ello se siguió el método manual descrito en la literatura (Rivetti y Guthold, 2003) y representado en la **Figura IV.5b**, midiendo el ángulo con el programa ImageJ (NIH).

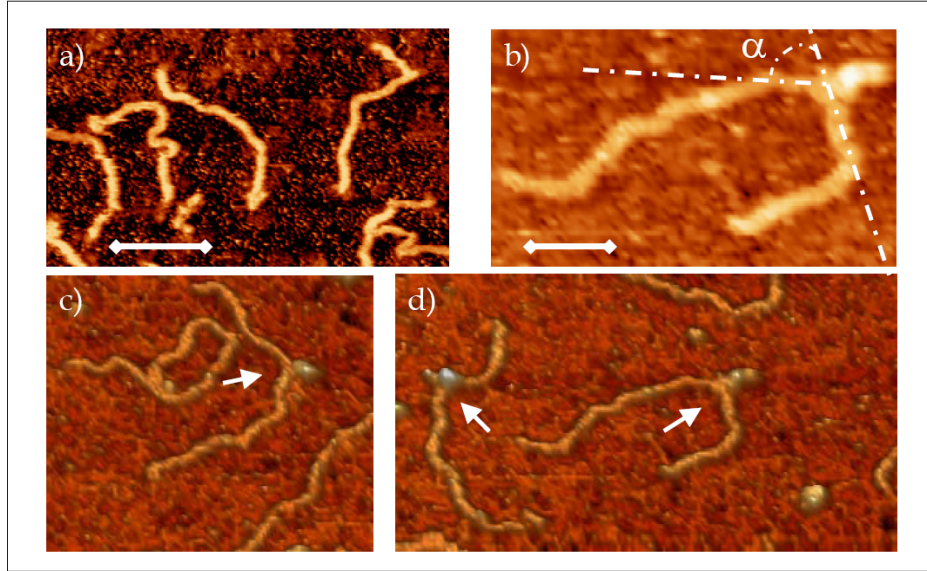


Figura IV.5. a) Imagen de una muestra de ADN en ausencia de proteína. La barra de escala representa 110 nm. b) Imagen de un complejo TtgV-ADN sobre la que se indica la forma empleada para medir el ángulo, *i.e.* trazando manualmente tangentes a los brazos de ADN emergentes del sitio de unión de la proteína. La barra de escala corresponde a 40 nm y la escala de colores (de alturas) corresponde a 4,5 nm. c) y d) muestran dos campos de una muestra de complejos TtgV-ADN, señalados con flechas.

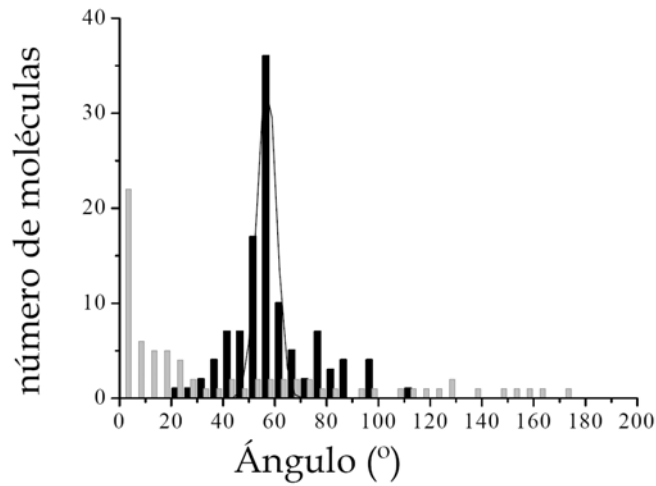


Figura IV. 6. Histogramas de las distribuciones de ángulos medidos en 111 complejos [TtgV-ADN] (en negro) y en 75 moléculas de ADN libre, en muestras sin proteína (en gris). En este caso se midió el ángulo alrededor del sitio de unión de TtgV en el centro del fragmento. El centro de la función gaussiana a la que se ajustó la primera distribución es $(56,8 \pm 3,2)^\circ$ (siendo $3,2^\circ$ la desviación estándar).

La **Figura IV. 6** muestra el histograma de la distribución angular de los complejos [ADN-TtgV] (en negro) y el histograma de la distribución de ángulos medidos en torno al sitio de unión de la proteína en el ADN desnudo (aproximadamente en el centro del fragmento) (en gris). La distribución de ángulos del ADN libre es muy amplia y está centrada en 0° (correspondiente a la configuración recta), lo que denota la ausencia de un ángulo preferencial. Por el contrario, la estrecha distribución de ángulos de los complejos, con un α promedio de $(57 \pm 13)^\circ$ indica que la unión de TtgV induce un cambio conformacional en el ADN.

IV.1.3. Discusión

La información estructural de complejos individuales [TtgV-ADN] obtenida por AFM completa el cuerpo de datos bioquímicos y biofísicos preexistentes procedentes de ultracentrifugación analítica, dicroísmo circular, mutagénesis dirigida, calorimetría de valoración isotérmica (ITC), ensayos de *footprinting* y ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)- y contribuye a sugerir un modelo global compatible con ellos.

Los resultados revelaron que el represor TtgV induce una flexión convexa en el ADN (con un ángulo promedio de 57°).

El sitio de unión de TtgV está situado en la región común de los dos promotores a los que reprime (P_{TtgGHI} y P_{TtgVW}). En general se considera que los represores de la familia IclR actúan como tales impidiendo la unión de la ARNp al promotor por simple oclusión de éste. El caso de TtgV es más complejo pues al impedimento estérico se añade una distorsión de la estructura del ADN (el cambio de la distancia y de la disposición relativa entre las cajas de la ARNp) dificulta el reconocimiento del promotor y, por tanto, su transcripción.

Ésta es la primera configuración convexa descrita para un complejo de la familia IclR. Se trata de una configuración bastante rara, sólo adoptada por el 13% de las estructuras de complejos ADN-represor depositadas en el Protein Data Bank a día de hoy. Las proteínas LacI y CcpA (ambas de la familia LacI-GalR) por ejemplo, inducen flexiones en el ADN de $\sim 40^\circ$ y $\sim 35^\circ$ (Kalodimos *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2004) respectivamente (**Figuras IV.7a -b**) y presentan similitudes con el sistema aquí estudiado. Al igual que TtgV, LacI y CcpA interaccionan con el ADN mediante motivos HTH de gran plasticidad. Además sus sitios de unión están partidos en dos, como ocurre con las dos repeticiones invertidas a las que se une el tetrámero de TtgV. Podemos esperar por tanto que la

estructura del complejo TtgV-ADN a nivel atómico se asemeje a las de estos dos represores (**Figura IV.7c**).

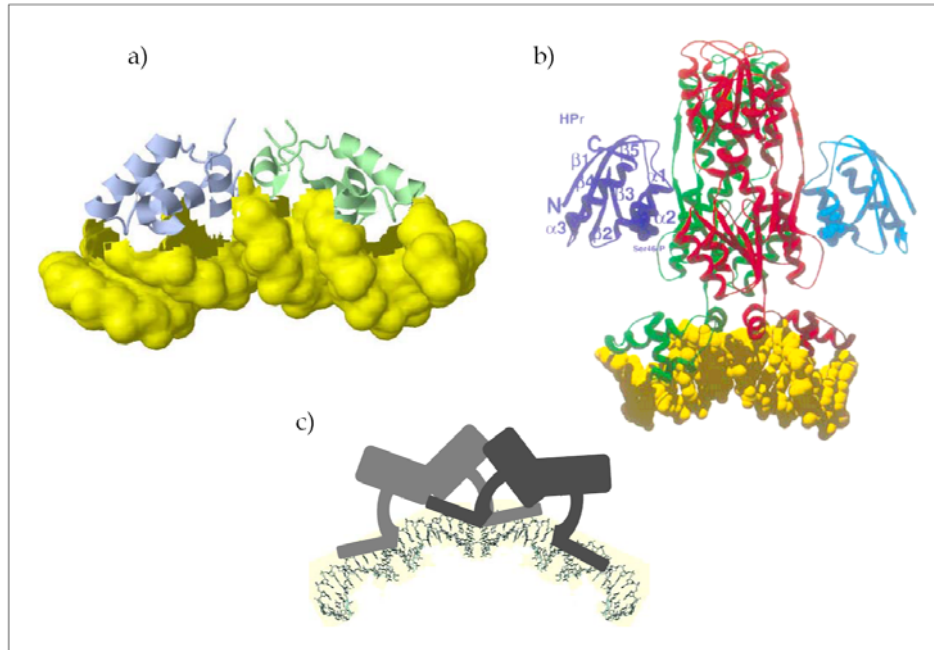


Figura IV. 7. **a)** Esquema de la estructura tridimensional del complejo formado por un dímero del represor *lac*: *lacHP62* y su operador *O1*. Esta imagen ha sido generada a partir del pdb 1L1M, mediante el programa Jmol. **b)** Estructura del complejo formado por la proteína CcpA (y, en azul, el co-represor unido a ella: HPr-Ser46-P) y un fragmento de ADN de 16 pb contenedor de sus sitio de unión (Schumacher *et al.*, 2004). **c)** Esquema de la configuración propuesta del complejo TtgV-ADN.

La **Figura IV.8** muestra un esquema general del ciclo regulado por TtgV. La proteína TtgV actúa como represor de dos promotores divergentes P_{TtgGHI} y P_{TtgVW} . La transcripción de estos promotores se activa en presencia de los efectores de TtgV, *i.e.* de sustancias como el tolueno que nutren la bacteria pero que a partir de una concentración umbral pueden resultar tóxicas. Como resultado de unir una molécula de efector, TtgV disminuye su afinidad por el ADN y queda des-reprimido el sistema, transcribiéndose las proteínas que constituyen la bomba TtgGHI encargada de expulsar dichas sustancias. Simultáneamente, se activa la expresión de la propia proteína represora TtgV con el fin de garantizar que, en el momento en que se recuperen los niveles normales de los efectores, la producción de la bomba que los expulsa se interrumpe. TtgV, ya libre de

efector, adopta la conformación adecuada para unirse de nuevo al ADN y ejerce su función represora. Resulta plausible imaginar que la activación/desactivación de la expresión de la bomba y el cambio conformacional del represor por unión/liberación del efector estén coordinados a través de una misma concentración umbral de dicho efector: es decir, que coinciden la concentración a partir de la cual es necesario expulsar el efector con la concentración a partir de la cual la probabilidad de su unión al bolsillo de TtgV se dispara.

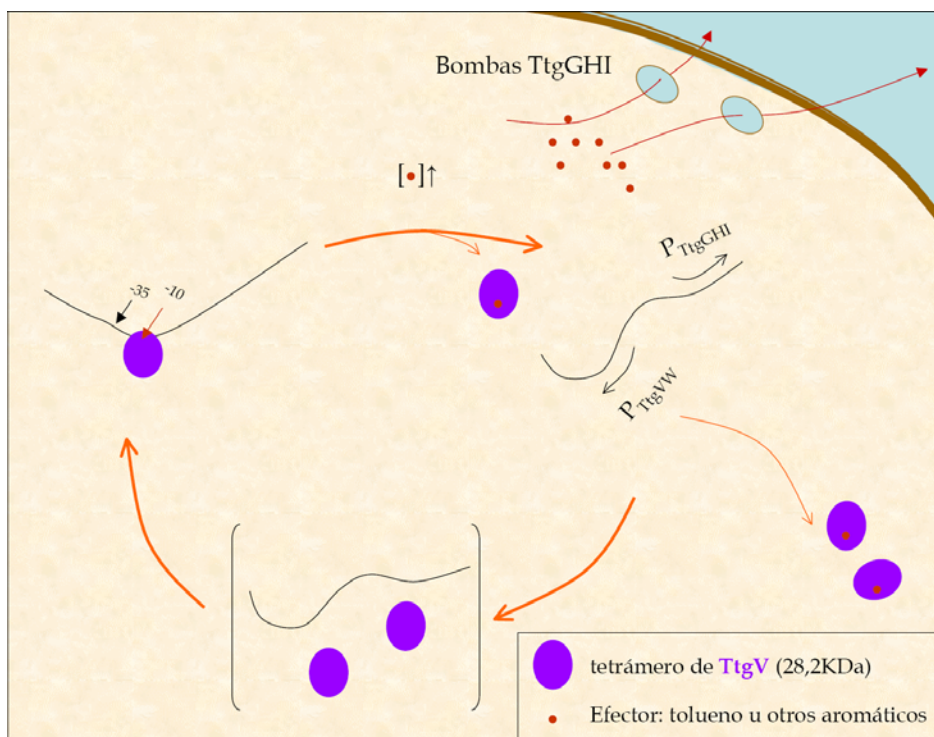


Figura IV. 8. Esquema-resumen del mecanismo de regulación estudiado.

Se trata de un sistema de regulación muy sencillo y muy eficaz, basado en un sólo componente cuya función está regulada por la presencia de pequeños ligandos: sus efectores. Como veremos a lo largo de esta tesis existen distintos mecanismos de respuesta sensibles a pequeñas fluctuaciones del estímulo externo que los regula. Este mecanismo, el de un único componente regulado por un ligando o efector, es el más sencillo de todos ellos.

El mecanismo estudiado resulta ser aún más complejo que el presentado en la introducción, al coordinarse con un segundo mecanismo:

TtgV regula la expresión de otra bomba, la *ttgDEF*, además de la de la bomba *ttgGHI*. La proteína TtgT es el regulador específico de esta bomba y el promotor P_{TtgT} que la codifica se transcribe en sentido inverso al P_{TtgDEF} , lo que indica el paralelismo con el sistema P_{TtgGHI} y P_{TtgVW} aquí estudiado. Sin embargo la afinidad de TtgV por la región P_{TtgDEF} - P_{TtgT} es mayor que la de la propia proteína TtgT e incluso superior a la que presenta TtgV por su sitio de unión en la región P_{TtgGHI} - P_{TtgVW} (Fillet *et al.*, 2009)

Con este juego de afinidades se está garantizando la represión total de la expresión de ambas bombas en ausencia de disolventes orgánicos y la rápida respuesta tanto a su aparición, como al aumento y a la disminución de su concentración respecto del umbral. La presencia del efector en concentración suficiente favorece su unión al bolsillo receptor de efector de TtgV, y el cambio estructural que provoca esta unión conduce a la separación de TtgV de sus sitios de unión. Se activa entonces la transcripción de los promotores de las bombas y de los represores TtgT y TtgV, que, sin embargo, se mantendrán en solución hasta que no descienda la concentración de disolvente (efector). Una vez recuperados los valores basales de éste, TtgV vuelve a actuar como represor uniéndose a las regiones promotoras, interrumpiéndose así su producción y la de las bombas de extrusión.

IV.1.4 Perspectivas

Sería interesante caracterizar la estructura de los complejos TtgV-ADN y TtgT-ADN en torno a la región de los promotores P_{TtgDEF} - P_{TtgT} , buscando confirmar si estos represores flexionan igualmente el ADN, y por tanto si el mecanismo de represión incluye la oclusión y la distorsión de la secuencia.

El trabajo de este capítulo se realizó en colaboración con la Dra. M^a Eugenia Guazzaroni, del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos dirigido por el Prof. Juan L. Ramos (Departamento de protección medioambiental de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada).

IV.2. Regulación de la transcripción en *Pseudomonas putida*.

Papel de los factores de transcripción TodT (represor) e IHF (activador).

IV.2.1. Introducción

La bacteria *Pseudomonas putida* DOT-T1E, como ya mencionado en el capítulo IV.A, emplea tolueno y otros disolventes orgánicos como fuente de carbono y de energía, a partir de su oxidación a especies intermediarias del ciclo de Krebs (Zylstra *et al.*, 1988). Para ello la bacteria induce la expresión del operón catabólico *tod* (*todXFC1C2BADEGIH*) que codifica las enzimas dioxigenasas que convierten los hidrocarburos aromáticos en ácidos tricarboxílicos.

Los genes *todST* forman un operón expresado de forma constitutiva, localizado inmediatamente después del operón *todXFC1C2BADEGIH*, y codifican el sistema sensor de dos componentes, TodS/TodT, encargado de la regulación de la expresión a partir del promotor P_{todX} . Los sistemas reguladores bacterianos de dos componentes median en una gran cantidad de respuestas a estímulos ambientales, como la osmorregulación y la quimiotaxis. Normalmente estos sistemas están formados por dos elementos funcionales: un sensor histidina-quinasa al cual se une la señal y una cadena reguladora de la respuesta cuya actividad está regulada.

TodS es una quinasa que fosforila residuos de histidina (una “histidina-quinasa”) que une tolueno con gran afinidad ($\sim 700\text{nM}$), el cual a su vez aumenta la autofosforilación de TodS (Busch *et al.*, 2007).

TodS transfosforila a **TodT**, un regulador transcripcional que interacciona con la región del promotor P_{todX} y regula la transcripción del operador *tod* (Lacal *et al.*, 2006). La fosforilación de proteínas es un mecanismo regulador clave, ampliamente utilizado para regular la actividad de enzimas y factores de transcripción. TodT (28kDa) contiene dos dominios: un dominio N-terminal (NTD) receptor del grupo fosfato que le proporciona la sensor-quinasa TodS, y un dominio C-terminal de unión al ADN, con un motivo HTH. TodT se une específicamente y en forma de monómero, tanto en su forma fosforilada como en su forma libre de fosfato (ambas con afinidad similar), a tres sitios (las cajas 1, 2 y 3) centrados en las posiciones -106, -85 y -57 respecto del inicio +1 de la transcripción del promotor P_{todX} (**Figura IV.9a**). Las cajas 1 y 2 presentan secuencias pseudo-palindrómicas y la caja 3 el motivo de medio

IV.2. Resultados

palíndromo. La unión de TodT a estas tres cajas presenta constantes de afinidad relativamente bajas ($K_d \sim 1,6\text{--}6,3 \mu\text{M}$). Sin embargo esta baja afinidad se compensa con un mecanismo de unión cooperativa. La constante de afinidad es máxima para la caja 1, y se reduce 3 y 4 veces en las cajas 2 y 3, respectivamente (Lacal *et al.*, 2008a). Además dentro de las cajas 1 y 2 la unión de los dos monómeros a la secuencia palindrómica es igualmente cooperativa.

Las tres cajas participan en la regulación de la transcripción, sin embargo la caja 1, por la que TodT presenta máxima afinidad, es imprescindible para una unión efectiva a todas las cajas y la transcripción del operador *tod*. Por ello se considera punto de nucleación de la unión de todos los monómeros de TodT al ADN y de la formación del complejo de transcripción con IHF y ARNp (Lacal *et al.*, 2008).

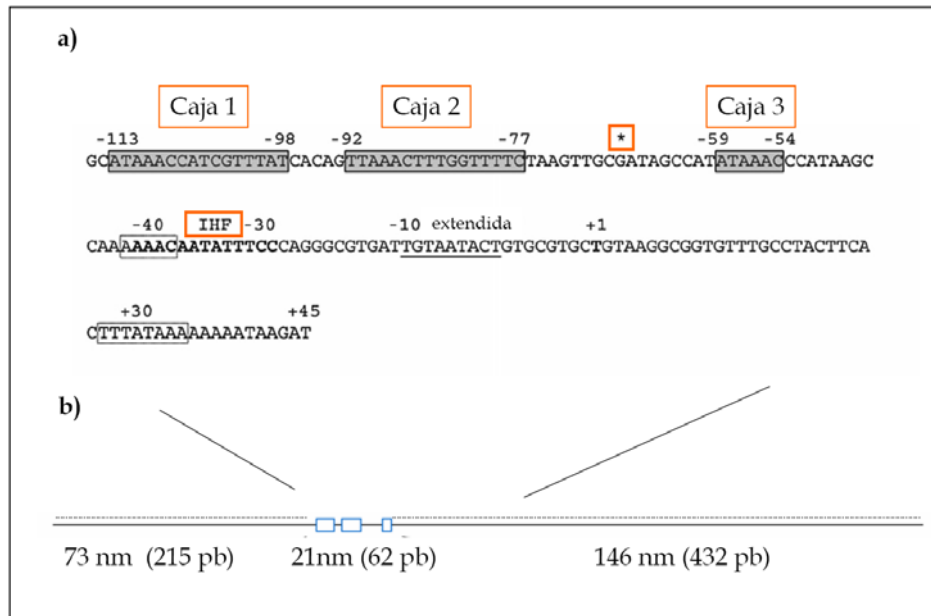


Figura IV.9 a) Secuencia de la región del promotor P_{todX} , desde la posición -115 hasta la +45. Los recuadros grises indican las cajas de unión del regulador TodT y el sitio de unión de IHF está resaltado en negrita. El asterisco indica la Guanina -68 en la que se observa una hipersensibilidad en los ensayos de protección de ADNasaI. Asimismo, se indican el sitio +1 de inicio de la transcripción y la caja -10 extendida de reconocimiento de la ARN-polimerasa. Ésta y el activador IHF, situado entre las bases -40 y -30, “suplen” la ausencia de la caja -35 de la ARNp en este promotor. **b)** Esquema de la sonda empleada en los experimentos de AFM. Se generó por PCR y contiene la secuencia entre los nucleótidos -327 y +382 respecto del promotor P_{todX} (709-pb; ~240nm) con las tres cajas de unión de TodT situados de forma asimétrica respecto de los extremos.

El factor de integración del hospedador **IHF** (23 kDa) actúa como activador del promotor P_{todX} , puesto que en su ausencia la expresión del operón *tod* se reduce cinco veces, uniéndose como dímero a un sitio adyacente a la caja 3.

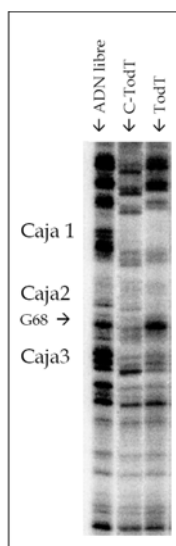


Figura IV.10. Ensayo de protección de ADNasaI realizado para caracterizar la unión de TodT y C-TodT al promotor P_{todX} . En ambos casos, por comparación con el carril del ADN libre, se muestra claramente la protección de las cajas de unión debida a la presencia de proteína. En el carril de TodT se observa la hipersensibilidad correspondiente a la Guanina -68. (Imagen proporcionada por Jesús Lacal).

Los datos de partida apuntaban a que la activación de la transcripción de este promotor implica un contacto entre la ARNp y TodT, concretamente vía la α -CTD de la ARNp, por analogía con otros sistemas de regulación. Esto exige una configuración en curva del promotor, dada la amplia separación entre las cajas de unión de TodT y los sitios de la polimerasa (Lacal *et al.*, 2006). Los experimentos de huella de hiperreactividad ante DNasa de la **Figura IV.10** mostraban una hipersensibilidad en la posición -68 que podría corresponder con un ángulo en el ADN inducido por la unión de TodT. Idénticos experimentos realizados con el mutante de TodT sin el dominio N-terminal (el así llamado C-TodT) no muestran ninguna hiperreactividad, y este mutante no es funcional, lo que apoya la idea de que el dominio N-terminal de la proteína (tal vez la interacción entre los dominios N-terminal de varios monómeros de TodT) juega un papel clave en tal flexión y en la activación de la transcripción. Además IHF participa en la activación y represión de un gran número de sistemas en los que el sitio de unión de un segundo regulador y el de inicio de la transcripción están muy alejados (Zurla *et al.*, 2007), por lo que actúa induciendo una flexión en el ADN (Seong *et al.* 2002). Se propuso que el ángulo que induce sobre el ADN puede facilitar la formación del complejo de transcripción en P_{todX} .

Planteamiento de los experimentos de AFM:

- Caracterización de la estructura del ADN en los complejos binarios: [TodT-ADN], [C-TodT-ADN] y [IHF-ADN].
- Caracterización de la estructura del ADN en el complejo ternario: [TodT-IHF-ADN]

IV.2.2. Resultados**Complejos binarios [TodT-ADN_{Ptodx}]**

La baja afinidad de TodT por el ADN exige que la formación de complejos se realice a altas concentraciones de proteína, condiciones que dificultan la toma de imágenes con el AFM. De esta forma los complejos se incubaron en relaciones molares en el rango [30:1 y 70:1] y a una concentración final de ADN de 10 nM. Las condiciones utilizadas en la formación de los complejos y de preparación de las muestras de AFM se especifican en los apartados III.3 y III.4.B del capítulo III de Materiales y Métodos.

Los ensayos de EMSA (**Figura IV.11**) indican la formación de cuatro complejos distintos [TodT-ADN_{Ptodx}]. El análisis de huella de cada una de las bandas permitió asociarla con un complejo concreto. Así: el Complejo I se relacionó con el complejo donde TodT se une a la Caja 1 (de máxima afinidad), el complejo II al complejo en el que TodT se une a las cajas 1 y 2, y los complejos III y IV, al complejo con las tres cajas ocupadas. La mutación de la Caja 3 dio lugar a la desaparición de los complejos III y IV, lo que dio pie a proponer que ambos complejos presentaban las tres cajas ocupadas por cinco monómeros pero que diferían en su conformación tridimensional y por tanto en su retardo (Lacal *et al.*, 2008b).

Las condiciones de incubación empleadas en las muestras caracterizadas por AFM, con concentraciones de proteína en torno a 300-450 nM, corresponden a una mezcla en la que coexisten los cuatro tipos distintos de complejos TodT-ADN: I, II, III y IV (**Figura IV.11**). Los complejos III y IV se pueden asociar a aquellos complejos con todas las cajas de TodT ocupadas, adoptando dos conformaciones distintas, puesto que ambos complejos desaparecen al usar un ADN sin la caja 3 (Lacal *et al.*, 2008b).

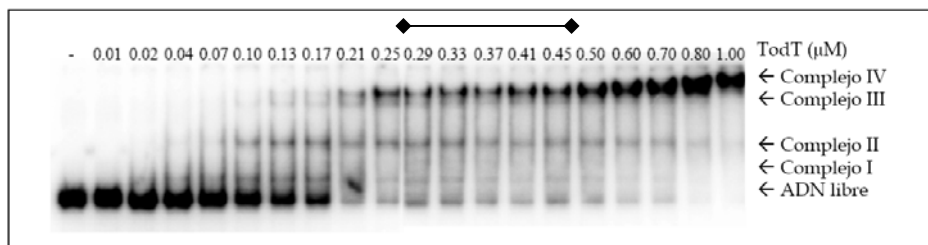


Figura IV.11. Ensayo de EMSA de la unión de TodT a la región del promotor P_{todX} . Las cuatro bandas diferenciadas se asociaron con cuatro complejos distintos, basándose en los resultados de los ensayos de huella de ADNasaI como explicado en el texto. El segmento superior indica el rango de concentraciones de las muestras estudiadas con AFM.

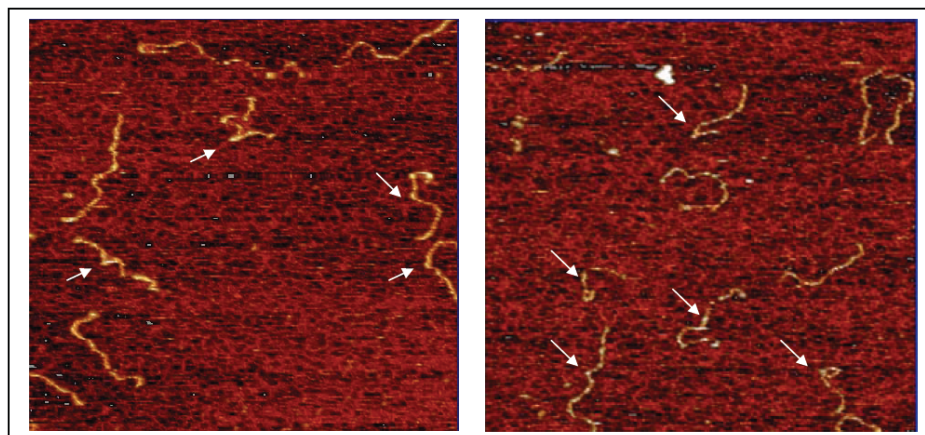


Figura IV.12. Ejemplo de dos campos en sendas muestras de complejos [TodT-ADN $_{P_{\text{todX}}}$], incubadas según una relación proteína:ADN de 66:1. Las flechas señalan las moléculas de ADN con proteína.

Se observaron complejos correspondientes a estequiometrías TodT_x-ADN variables, divisibles en dos poblaciones distintas: una de complejos con configuración más o menos lineal, que se denominaron complejos “primarios” (Figura IV.13.a-d), y otra de complejos con una estructura doblada, tipo horquilla, que se denominaron complejos “secundarios” (Figura IV.13.e-i). Los complejos “primarios” fueron asociados con las bandas de los complejos “I, II y III” de los experimentos de EMSA (Figura IV.11) y los complejos “secundarios” se asociaron con la banda del “complejo IV”.

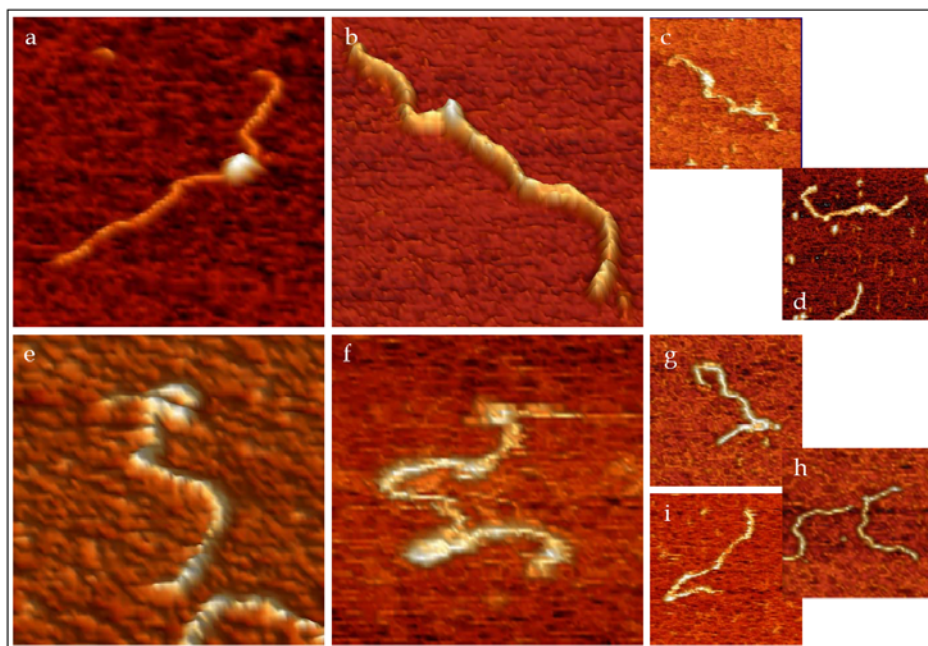


Figura IV.13. Catálogo de complejos [TodT-ADN_{P_{todX}}] encontrados. Las imágenes **a-d** muestran complejos lineales con ocupación variable de las cajas ("complejos primarios"). Los complejos **e-i** son ejemplos de la configuración de tipo horquilla descrita en el texto ("complejos secundarios").

Se midieron las distancias entre la proteína unida y el extremo del fragmento de ADN más próximo (L_1) en los complejos "primarios", y la longitud total del ADN (L_{total}) y la distancia entre el vértice de la estructura tipo horquilla y el extremo del ADN más cercano (L_2) en los complejos "secundarios". El cuadro de la **Figura IV.14.d** resume los resultados numéricos encontrados. Las distancias esperadas para estas tres longitudes se representan en la **Figura IV.14.a**. La longitud de contorno del ADN en el complejo resultó 227 ± 16 nm, próxima a los 239 nm teóricos (calculados a partir de la relación 0,338nm/pb). Los complejos "primarios", de configuración lineal, sitúan la proteína a 69 ± 10 nm del extremo del fragmento ($N=11$), lo que es coherente con la unión de TodT a la Caja 1. Los complejos "secundarios" mostrados en la **Figura IV.14.b** pliegan el ADN en una estructura de tipo horquilla cuyo vértice se sitúa a una distancia promedio de 82 ± 9 nm del extremo más próximo del ADN, *i.e.* entre las cajas 2 y 3, lo que es compatible con un modelo de flexión de la horquilla en la hiperreactividad mencionada (**Figura IV.10**) encontrada en la Guanina - 68 (a 85 nm del extremo). Este modelo queda apoyado además por el hecho de que dicha hiperreactividad no se dé en los complejos con el mutante C-

TodT y que no se encontrara ningún complejo [C-TodT-ADN] con una configuración de tipo horquilla.

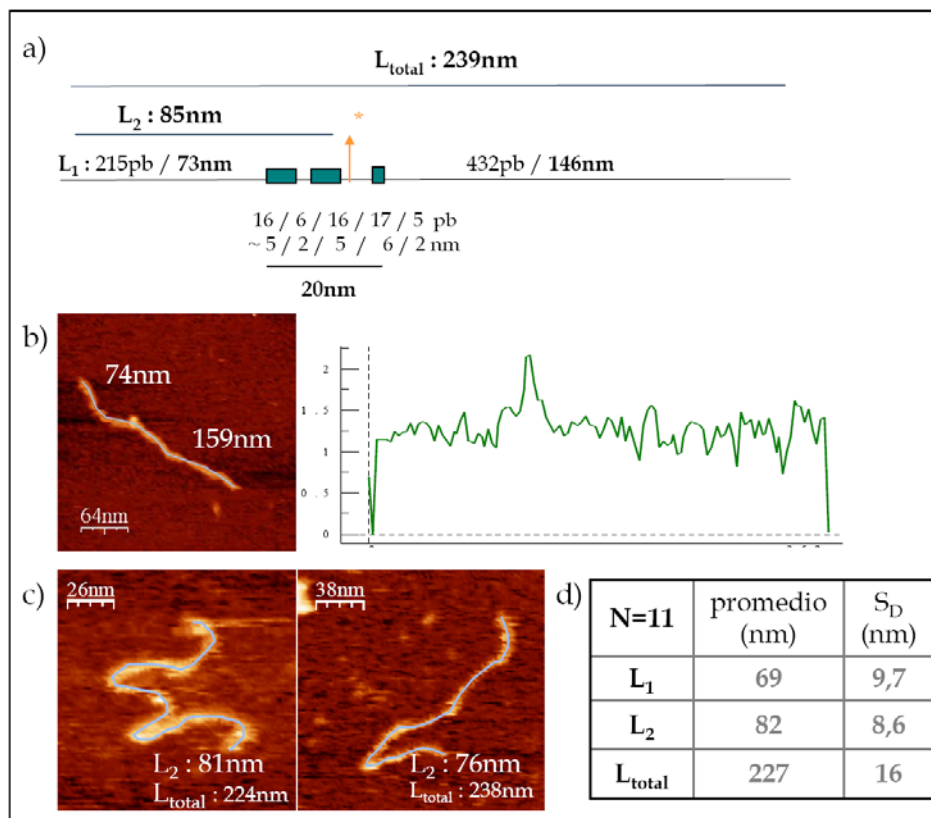


Figura IV.14. a). Esquema del fragmento de ADN que incluye las longitudes de las distancias al extremo más cercano de la caja 1 (L_1), de la G -68 (L_2 , hipotético vértice de la horquilla) y la longitud total del fragmento (L_{total}), todas ellas calculadas a partir de la relación: 0,338nm/pb. b) Ejemplo de complejo "primario" y su perfil. c) Ejemplos de complejos "secundarios" para los que se indican los valores de L_{total} y L_2 . d) cuadro resumen de los valores estadísticos (media y desviación estándar) encontrados para los parámetros indicados en (a): L_1 , L_2 y L_{total} en 11 complejos inequívocos.

Complejos binarios [IHF-ADN_{Ptidx}]

Las imágenes obtenidas de los **complejos binarios [IHF-ADN_{Ptidx}]** (Figura IV.15) muestran que la unión de esta proteína al ADN es bastante inespecífica, pues se observa proteína a lo largo de toda la longitud de la cadena. No se buscó optimizar la resolución de estas imágenes, dado que el objetivo era comprobar que la proteína se unía en las relaciones ADN-IHF

de los ensayos bioquímicos, para después pasar directamente a caracterizar el complejo ternario.

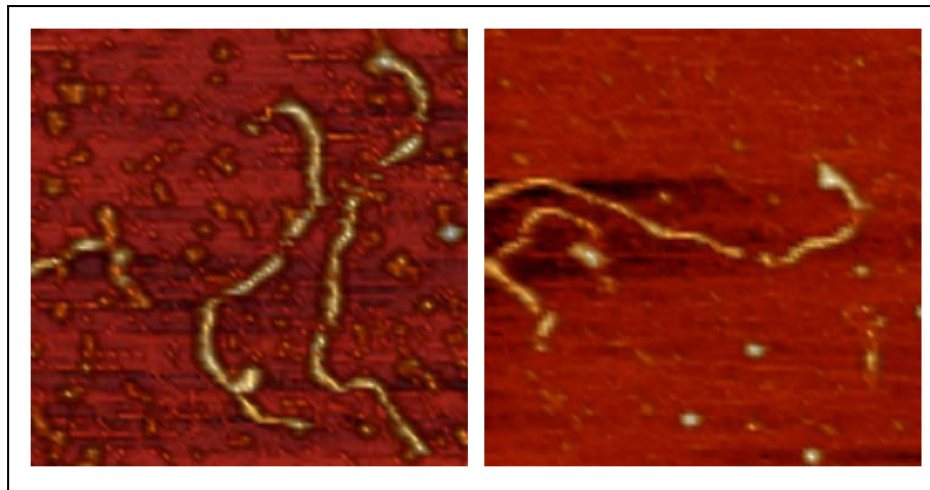


Figura IV.15. Dos ejemplos de complejos binarios [IHF-ADN_{P_{todx}}].

Complejos ternarios [TodT_x-IHF-ADN_{P_{todx}}]

Las muestras de complejos ternarios [TodT-IHF-ADN_{P_{todx}}] mostraron estructuras plegadas de tipo horquilla (**Figura IV.16.a**) equivalentes a las de los complejos “secundarios” encontrados en las muestras binarias: [TodT-ADN_{P_{todx}}]. Analizando la estructura de 15 complejos (cuadro de la **Figura IV.16.b**) se observó que esta estructura ternaria mantiene la posición del vértice de la horquilla a una distancia similar a la de los complejos binarios (dentro del error), en todo caso desplazándola hacia la Caja 3 y el sitio de IHF.

Asimismo, se observó que el porcentaje de complejos con estructura de tipo horquilla en las muestras ternarias aumenta con respecto al encontrado en las muestras de complejos binarios [TodT-ADN_{P_{todx}}], pasando de un 18% en las muestras binarias a un 45% en las muestras ternarias. (Estos porcentajes son aproximados y se estimaron a partir de 56 eventos en muestras binarias y de 29 eventos en muestras de complejos ternarios, cuantificando el número de complejos encontrados por área en distintas regiones de la muestra donde se observaban más de cinco cadenas de ADN). Se concluye que IHF ayuda a estabilizar dicha estructura.

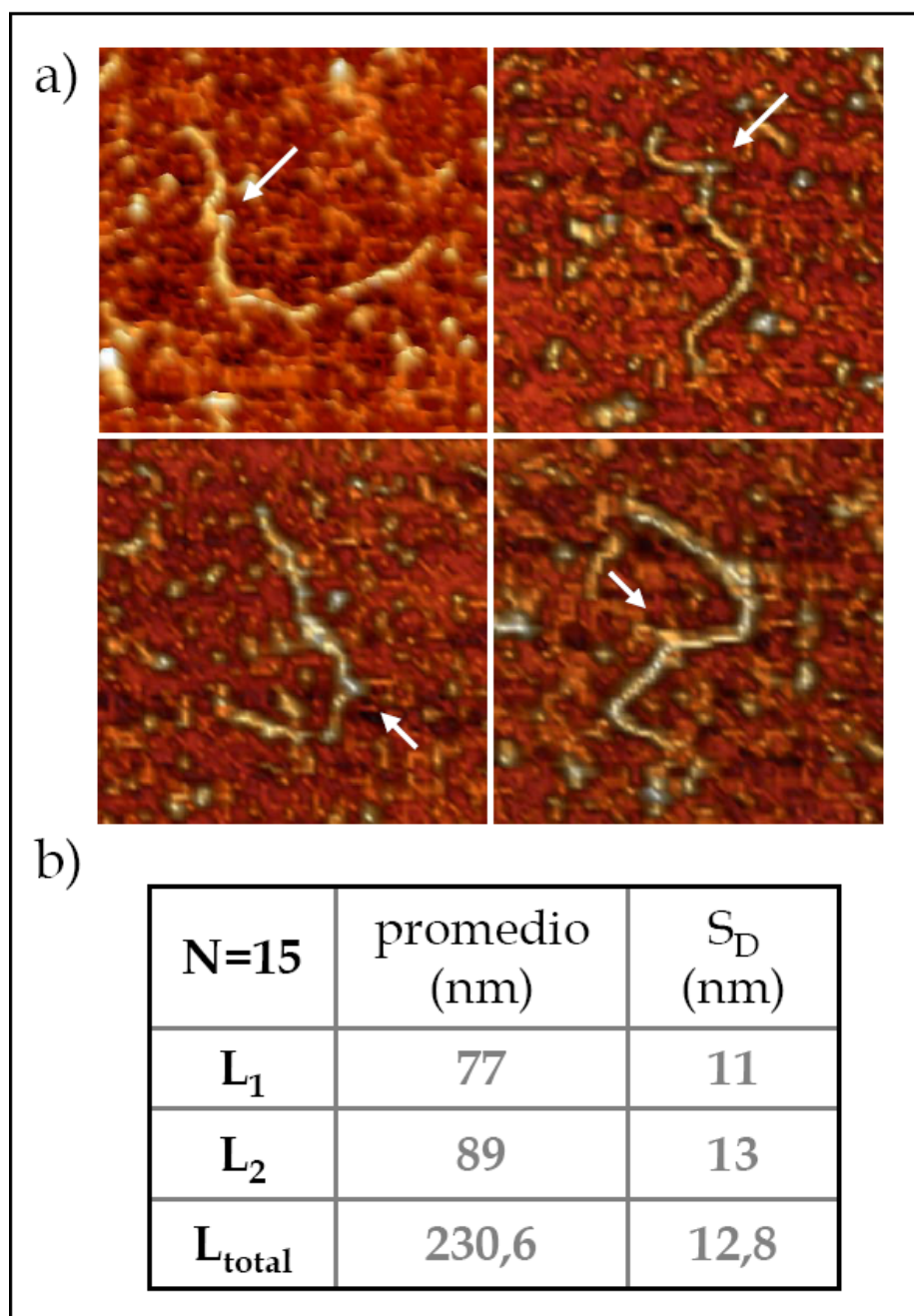


Figura IV.16. a) Ejemplos de complejos ternarios [TodT-IHF-ADN_{P_{todX}}]. b) Cuadro resumen de los valores estadísticos (media y desviación estándar) medidos para los mismos parámetros indicados en la Figura IV.14.a: L₁, L₂ y L_{total} en 15 complejos inequívocos.

IV.2.3. Discusión

TodT pertenece al grupo de factores de transcripción comentado en la introducción cuya actividad es modulada por modificación covalente. Une el fosfato que le proporciona la quinasa TodS, la cual se localiza en la membrana interna de la bacteria (como otros sensores histidina-quinasa) y está regulada por señales extracelulares. Un sistema de regulación similar a éste es el de NarL de *E. coli*, que controla la expresión de los genes de la ruta anaeróbica. NarL se une al ADN sólo cuando ha sido transfosforilada por las quinasas: NarX y NarQ, que a su vez son reguladas por nitrito o iones nitrato extracelulares (Browning *et al.*, 2004).

El modelo estructural sugerido por los resultados se representa en la **Figura IV.17**. La estructura tipo horquilla se pliega a partir de la hiperreactividad por interacción entre los dominios N-terminales de TodT, concretamente de las Cajas 2 y 3. El aumento de complejos con estructura plegada observado en presencia de IHF es igualmente compatible con este modelo: por un lado IHF aporta una interacción adicional para la unión cooperativa de TodT a la Caja 3 y por el otro esta configuración propuesta enfrenta las proteínas: IHF y TodT de la Caja 1 favoreciendo su interacción y la consecuente estabilización de la estructura. Los estudios estructurales recogidos en la literatura sobre complejos ADN-IHF (Seong *et al.*, 2002) describen una configuración angular inducida por la unión de IHF. El modelo aquí propuesto para la estructura del complejo ternario acepta la inducción de un ángulo por IHF, que sin embargo no cambia la configuración global del complejo con respecto a la del binario. En el complejo binario la estructura de horquilla se cerraría por interacción de las dos proteínas TodT en la caja 1 con la hebra del ADN opuesta en la estructura.

De la conjunción de los resultados estructurales y bioquímicos se extrae que la cooperatividad de la unión reside en el dominio C-terminal (puesto que los mutantes C-TodT se unen al ADN con afinidad similar a la de TodT silvestre) y que por tanto la unión de fosfato (al dominio N-terminal) no afecta a dicha afinidad. Por otro lado, el dominio N-terminal resulta esencial para la formación de la estructura plegada, la estructura funcional del mecanismo de regulación, puesto que el mutante C-TodT no la genera.

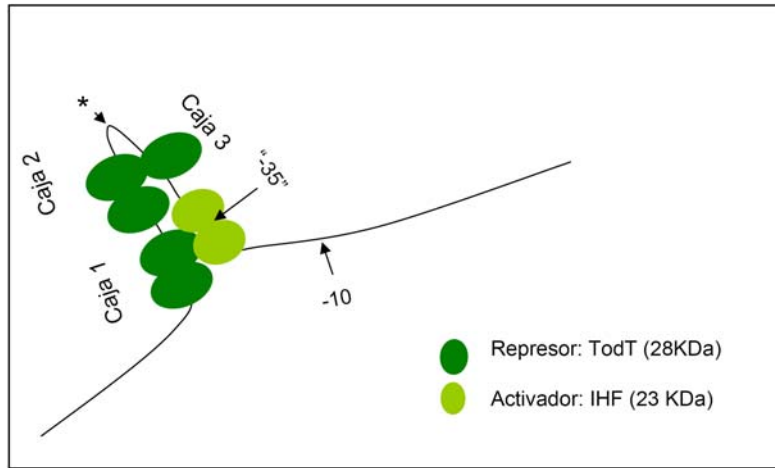


Figura IV.17. Modelo propuesto de configuración de tipo horquilla de los complejos binarios [TodT-ADN_{P_{todX}}] y ternarios [TodT-IHF-ADN_{P_{todX}}]. Se indican las tres cajas de unión de TodT, el sitio de unión del dímero de IHF, el vértice de la horquilla (asociado en el modelo con la hiperreactividad de la G-68) y la caja -10 de reconocimiento de la ARN-polimerasa. Se señala además la posición de la caja -35, inexistente en este promotor, para destacar el papel que juega IHF en la estabilización de la ARNp.

El modelo de regulación inspirado por esta estructura se presenta en la **Figura IV.18**. La hipótesis defendida es la siguiente: TodT inhibe la transcripción a través de la interacción de la TodT de la caja 1 con las α -CTDs de la ARN-polimerasa, mientras IHF estabiliza la interacción de la ARNp con su promotor, por interacción con la subunidad σ (como "substituta" de la caja -35). La fosforilación de TodT induce un cambio conformacional que presumiblemente afecta a la interacción con las α -CTDs, lo que liberaría a la polimerasa (de otro modo "retenida"), sin deshacer necesariamente la estructura. Paralelamente mediante estas interacciones se está aumentando la probabilidad o la concentración local de la polimerasa en ese entorno, lo que hace de esta estructura una eficaz reclutadora de ARNp. Con ese modelo se pretendía explicar el papel de IHF como activador de la transcripción pudiendo coexistir con TodT mientras ésta realizaba su función inhibidora, reteniendo la ARNp.

Los experimentos de mutagénesis *in vivo* demostraron que la caja 1 es condición *sine qua non* para la activación de la transcripción de P_{TodX}, reduciéndose la expresión hasta 10 veces, mientras que la alteración de las cajas 2 y 3 sólo reducía la expresión entre 2 y 4 veces. Éste es otro resultado que apoya el modelo propuesto, puesto que son principalmente TodT de la caja 1 e IHF las encargadas de cerrar la estructura tipo horquilla y de estabilizar la ARNp en el promotor.

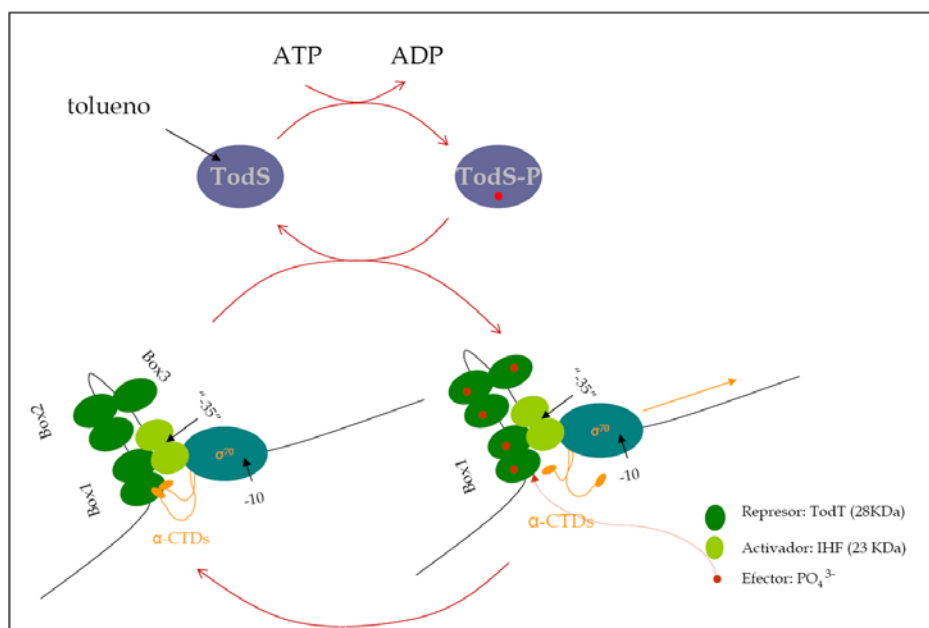


Figura IV.18. Modelo propuesto del mecanismo de regulación de la expresión del operón *todX*.

En resumen: la estructura funcional encargada de la regulación de la transcripción desde el promotor P_{TodX} propuesta es muy compleja. Requiere de la interacción entre los monómeros de TodT, el dímero de IHF y las distintas subunidades de la ARNp, y a su vez es activada por los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación de TodT como respuesta del sensor TodS/TodT a la presencia de tolueno en el medio.

IV.2.4 Perspectivas

Quedaría confirmar el modelo estructural por comparación entre las estructuras de los complejos binario y ternario formados con el promotor silvestre y con los promotores mutados en cada uno de los tres sitios de unión de TodT. Sería también interesante estudiar el complejo cuaternario con la ARNp [ADN-TodT-IHF-ARNp].

El trabajo de este capítulo se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Lacal, del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos dirigido por el Prof. Juan L. Ramos (Departamento de protección medioambiental de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada).

IV.3. Regulación de la transcripción en el microorganismo *Azoarcus* sp. CIB:

Papel del represor BzdR, de su efector benzoil-CoA, y del activador AcpR en la regulación de la expresión del operón catabólico bzdNOPQMSTUVWXYZA.

IV.3.1. Introducción

La bacteria *Azoarcus* sp. CIB es una β -proteobacteria desnitrificante utilizada como modelo para el estudio del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, capaz de crecer anaeróbicamente a partir de diversos compuestos aromáticos, por ejemplo el benzoato, como fuente de carbono. Dicho organismo presenta un *cluster* génico, el "*bzd*" (**Figura IV.19a**), que codifica el catabolismo anaeróbico del benzoato organizado en dos unidades transcripcionales, los operones *bzdR* y *bzdNOPQMSTUVWXYZA*. Este último operón codifica las enzimas que activan, desaromatizan y rompen el anillo del benzoato generando moléculas activadas con CoA que pasan a las rutas metabólicas centrales de la bacteria, donde son degradadas por sucesivas reacciones de reducción, β -oxidación y rotura de los anillos aromáticos (Barragán *et al.*, 2004 y 2005).

El **promotor** P_N controla este operón catabólico *bzd* y está regulado por dos proteínas: un **activador**, la proteína **AcpR** (un ortólogo de la proteína Fnr de *E. coli*) y un **represor**, la proteína **BzdR**, codificada por el gen localizado en la región anterior al *cluster bzd* con P_R como promotor.

Los **efectores** de ambos reguladores transcripcionales son el **oxígeno** y el **benzoil-CoA**. Como su ortólogo Fnr, AcpR une oxígeno (O_2) y adopta una conformación que estabiliza su forma monomérica, inactiva, mientras que en ausencia de oxígeno AcpR dimeriza, y puede unirse al ADN y activar el promotor P_N (Durante-Rodríguez *et al.*, 2007). La presencia de benzoil-CoA previene la represión del promotor P_N ejercida por BzdR. Por lo que se trata de un mecanismo de regulación doble o a dos niveles: por un lado, la presencia de una fuente de carbonos aromáticos (y con ella de benzoil-CoA) anula la represión de BzdR, y, por otro lado, el ambiente anaeróbico favorece la forma dimérica funcional del activador (cuya presencia resulta imprescindible para la transcripción desde el promotor P_N). De este modo se evitan gastos superfluos de energía.



Figura IV. 19. Esquema del cluster "bzd" y del promotor P_N .

a) El gen *bzdR* y el operón catabólico *bzdNOPQMSTUVWXYZA* son expresados a partir de los promotores P_R y P_N . La proteína BzdR reprime el promotor P_N y su efecto represor queda inhibido por el benzoil-CoA, que es el primer producto de la ruta catabólica del benzoato en condiciones anaeróbicas como muestra el recuadro. Una vez el benzoato es activado a benzoil-CoA (por una benzoato-CoA ligasa) entra en la serie de reacciones del metabolismo central de la bacteria pasando por todas las proteínas codificadas en el operón *bzdNOPQMSTUVWXYZ*.

b) Muestra la secuencia del promotor P_N , su sitio de inicio (+1), sus cajas -10 y -35 y el sitio de unión del ribosoma (RBS) y el codón de inicio ATG del gen *bzdN*. La secuencia enmarcada con trazo discontinuo es la de unión del activador AcpR y las secuencias recuadradas con trazo continuo corresponden a las de las tres regiones de unión de BzdR (I, II y III) y las flechas convergentes indican las secuencias palindrómicas a las que se une la proteína. (Esquema modificado de Barragán *et al.*, 2005).

- Activador AcpR

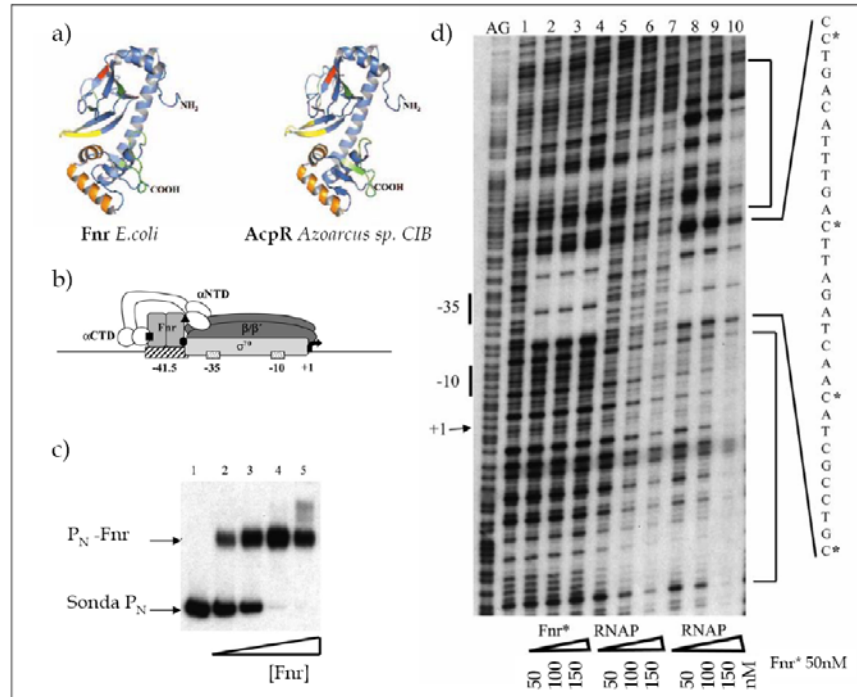


Figura IV.20. **a)** Modelo tridimensional de las proteínas ortólogas: Fnr de *E. coli* y AcpR de *Azoarcus* sp. CIB, compuestas por seis α -hélices, nueve láminas β , tres dominios de interacción con la ARN-polimerasa (AR1, AR2, AR3), coloreados en verde, rojo y amarillo, y un dominio HTH de unión al ADN (en naranja). **b)** Arquitectura del complejo formado por el promotor P_N (ejemplo de promotor de *clase II*) y su activador, el dímero de Fnr, ortólogo de AcpR. Los promotores de *clase II* tienen un sitio de unión centrado en torno a la posición -41,5 (bp) respecto de la posición +1 del inicio de la transcripción. Los dominios de interacción con la ARNp, AR1, AR2, AR3, están representados por un cuadrado, un triángulo y un círculo negros y contactan respectivamente con las subunidades α -CTD, α -NTD y σ^{70} de la ARNp. **c)** Gel de retardo que muestra el complejo específico formado por la sonda P_N y la proteína Fnr*, a concentraciones crecientes de esta última (0, 1, 2.5, 5, y 10 nM en los pocillos 1-5 respectivamente). **d)** Análisis de la huella frente a digestión con DNasa I de los complejos del promotor P_N con Fnr, ARNp y con ambas proteínas simultáneamente. Las hipersensibilidades ante la digestión de la DNasa se muestran en el esquema expandido con la secuencia de la región protegida por Fnr (i.e. del sitio de unión de Fnr). Las llaves que la flanquean corresponden a las zonas protegidas por la RNAP (concretamente por sus subunidades α -CTD y σ^{70}). (Figuras extraídas de Durante *et al.*, 2007).

La proteína **AcpR** es una proteína de 27860 Da (248 aa), con estructura similar a la de su ortólogo Fnr (de *E. coli*) (**Figura IV. 20a**). AcpR es necesaria para que se produzca la transcripción del promotor P_N , a pesar de que en su ausencia sí se forma el complejo cerrado de la ARNp con el promotor (como

indican los pocillos 5-7 del gel de la **Figura IV. 20d**). AcpR actúa a nivel del reconocimiento y la unión de la polimerasa en el promotor, y también a nivel del inicio de la transcripción (de la formación del complejo abierto). Los ensayos de *footprinting* (**Figura IV.20d**) mostraron que Fnr se une a una secuencia consenso centrada en la posición -41,5 (respecto de la +1 del promotor), solapando con la caja -35, por lo que podría establecer contactos con la ARN-polimerasa, a través de las subunidades α CTD, α NTD y σ de ésta (**Figura IV.20b**). Por ello P_N es clasificado dentro del grupo de “promotores de *clase II*” comentados en la Introducción (**Figura I.36b**), en este caso “dependientes de Fnr”. Asimismo, esta secuencia de unión solapa en seis bases con la del sitio *I* del represor BzdR y queda cercada por el sitio *II* (que comienza en la posición -45) lo que sugiere un control fino del mecanismo de regulación.

- Represor BzdR

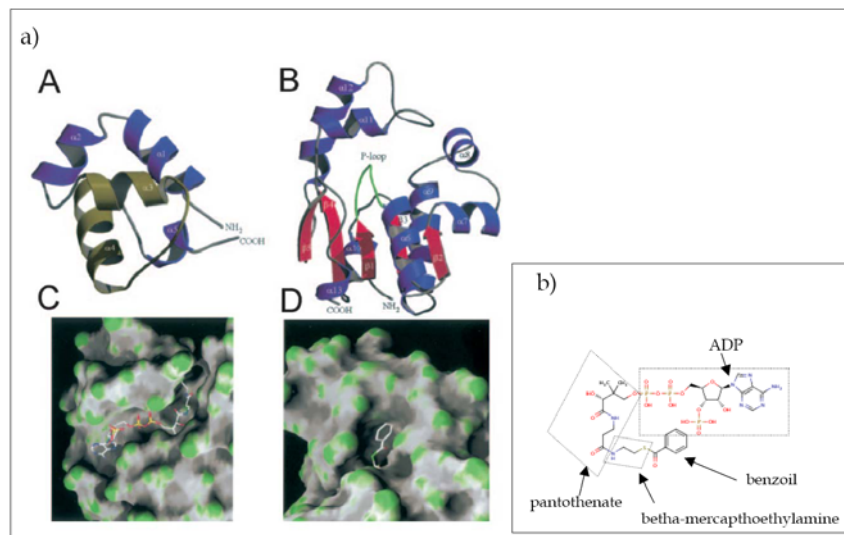


Figura IV. 21. a) Reconstrucción de la estructura modular de BzdR con sus dos dominios N-terminal y C-terminal. N-BzdR (**A**) contiene el dominio HTH de unión al ADN, con sus cinco hélices unidas por *loops* (en marrón). C-BzdR (**B**) contiene cinco láminas β (rojo) y ocho hélices α (azul) y un sitio de unión de fosfato (*P-loop*) que interacciona con la molécula de Bz-CoA. C y D muestran un modelo de la unión de la benzoil-CoA en las cavidades del dominio C-BzdR, realizado mediante un ajuste manual. (C) muestran la localización de los residuos de adenina, pantotenato y mercaptoetilamina y (D) la del benzoilo terminal. (Figura extraída de Barragán *et al.*, 2005). **b)** Estructura molecular del efector Benzoil-CoA (3'-fosfoadenosin 5'-(3-{(3R)-4-[(3-{[2-(benzoilsulfanil)etil]amino}-3-oxopropil)amino]-3- hidroxil- 2,2- dimetil- 4- oxobutil} dihidrógeno difosfato según la nomenclatura de la IUPAC y de fórmula molecular: $C_{28}H_{40}N_7O_{17}P_3S$), donde se indican los residuos mencionados en C y D.

La proteína **BzdR** (**Figura IV.21**) es una proteína de 33489 Da con estructura modular, con dos dominios unidos por un linker flexible de 40 aminoácidos. El dominio N-terminal se une al ADN mediante un dominio HTH (*helix-turn-helix*) y el dominio C-terminal une el efector benzoil-CoA. BzdR es el primer miembro de una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales (Barragán *et al.*, 2005).

Los ensayos de retardo (**Figura IV. 22a**) y de Ultracentrifugación analítica (UCA) muestran que BzdR se encuentra en forma de dímero en solución (también lo forma su mutante con sólo el dominio N-terminal, *N-BzdR*) y las reconstrucciones realizadas a partir de micrografías de microscopía electrónica conceden al dímero unas dimensiones de [6-7, 8-9, 6-7nm] (**Figura IV.22 b**).

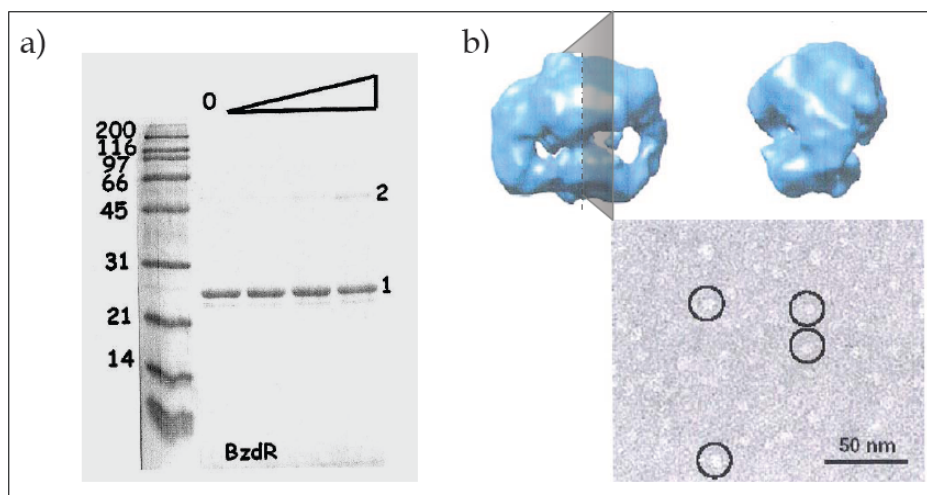


Figura IV.22. a) Ensayos de retardo y **b)** reconstrucción tridimensional de BzdR obtenida por microscopía electrónica y procesamiento de imagen que demuestran que BzdR es un dímero en solución. El plano vertical representa el plano de simetría entre ambos monómeros. (Figuras y resultados facilitados por Gonzalo Durante).

- Unión del efector de BzdR (BzCoA)

Al unir el efector benzoil-CoA (**Figura IV. 21b**) se produce un cambio conformacional de BzdR hacia una estructura más compacta según los resultados de Ultracentrifugación Analítica (UCA), que no ha podido ser caracterizada pues no se adhiere a la rejilla de ME. Esto puede ser debido bien a un cambio de la polaridad de los residuos que exponga la superficie de la nueva estructura (negativos para ser repelidos por la rejilla), bien a un desplegamiento de la cadena proteica. (El punto isoelectrico de esta proteína es ~ 6,7, siendo el intervalo de trabajo: 7-8,5).

- Unión de BzdR al ADN

En la región del promotor P_N , el genoma de *Azoarcus* presenta tres sitios definidos de unión del represor BzdR (las regiones I, II y III recuadradas en la **Figura IV.19b**), y un total de cuatro palíndromos de reconocimiento) (Barragán *et al.*, 2005; Durante *et al.*, 2008). No obstante, las distancias entre los palíndromos son muy distintas. La gran separación entre los dos palíndromos del extremo del sitio I exige que la secuencia intermedia sea flexible para unir ambos monómeros, y la alta proporción de bases ATs de esta región confiere dicha flexibilidad. Esta unión ADN-proteína tiene lugar mediante el dominio HTH en la región N-terminal de BzdR. Cada monómero contiene un dominio HTH, con cinco hélices α , de las cuales al menos dos realizan el contacto con el ADN (en general estos dominios contactan con el surco mayor del ADN) interaccionando con secuencias palindrómicas contenidas en el promotor (señaladas con flechas confluentes en la **Figura IV.19b**). Se trata del único ejemplo de esta familia en la que la unión se realiza como dímero (siendo lo habitual: tetrámeros con un único dominio HTH por monómero).

Experimentos de electroforesis han demostrado la formación de dos complejos nucleoproteicos específicos distintos entre el promotor P_N y BzdR, en función de la concentración de proteína (**Figura IV.23b**). Esto puede indicar una distinta estequiometría, sin embargo idénticos ensayos de retardo realizados con el dominio N-terminal de BzdR no muestran más que dos bandas: las correspondientes a la sonda libre y a un complejo específico [P_N - N-BzdR]. Este resultado parece indicar la posible existencia de una superestructura basada en interacciones proteína-proteína que el mutante N-BzdR no es capaz de establecer. La unión de BzdR induce por tanto cambios conformacionales en el ADN que se manifiestan en las hipersensibilidades del *footprinting* mostradas en la **Figura IV.23a**. Además en la huella se observan regiones, como la señalada en naranja, que parecen indicar un plegamiento de la cadena.

La unión de la proteína nativa a sus cajas presenta gran cooperatividad (**Figura IV.23c**). Mediante UCA (**Figura IV.23d**) se ha estudiado la estequiometría de los complejos en presencia de proteína en exceso. Se ha podido resolver de forma inequívoca la estequiometría de los complejos con el mutante N-BzdR (1:8), y se ha definido una estequiometría de forma no concluyente para los complejos con la proteína nativa BzdR de al menos ocho monómeros (1:8 ó 1:10). El posible quinto dímero podría unirse a través de una interacción proteína-proteína que, sin embargo, no ha sido demostrada). Un indicio de este quinto dímero aparece en la huella de la **Figura IV.23a**, en la que se obstruye el espacio entre los dos palíndromos del sitio I a medida que se aumenta la concentración de proteína. El *sitio I* se

encuentra sobre la caja -10 y el principio de la caja -35 del promotor, y solapando con el sitio de unión del activador AcpR (**Figura IV.19b**).

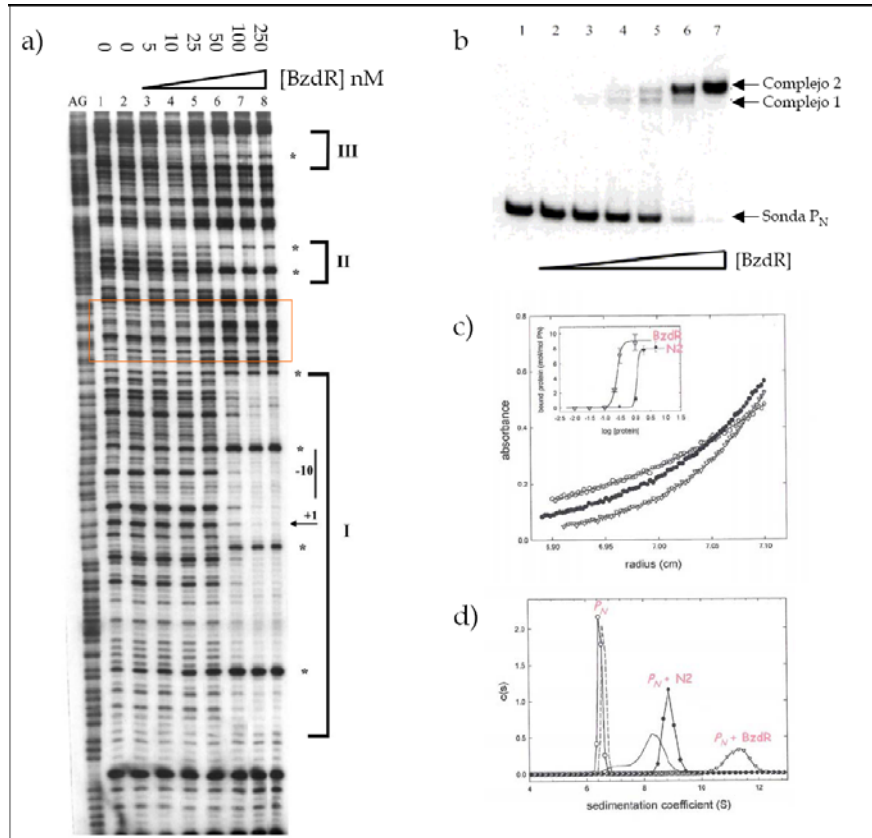


Figura IV.23. a) Ensayo de huella (o *footprinting*) con DNasa I en un gel de poliacrilamida-urea de los complejos entre BzdR (su mutante con Histidinas para la purificación) y la sonda con el promotor P_N (ADN_{P_N}). Las regiones protegidas por la proteína (I, II, III) están marcadas por llaves y las hipersensibilidades (de los enlaces fosfodiéster ante la actividad de la DNasa I) por asteriscos. (Figura extraída de Barragán *et al*, 2005). **b)** Gel de retardo de migración de complejos nucleoproteicos [ADN_{P_N}-BzdR] con concentración creciente de proteína de los pocillos 1 al 7 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50, y 100 nM respectivamente) y constante de P_N. Las flechas indican las bandas correspondientes a la sonda libre y a los dos complejos específicos [ADN_{P_N}-BzdR] “1” y “2”, de mayor y menor movilidad. (Figura extraída de Barragán *et al*, 2005). **c)** Ensayo de Ultracentrifugación Analítica que manifiesta la cooperatividad de la unión tanto de BzdR como del mutante N-BzdR. **d)** Ensayo de Ultracentrifugación Analítica que demuestra la estequiometría de los complejos nucleoproteicos: [ADN(P_N)-N-BzdR₈] y [ADN(P_N)-BzdR_x], donde x puede ser 8 ó 10. La diferencia entre los coeficientes de sedimentación de los complejos formados con BzdR y con N-BzdR no corresponde únicamente a un cambio de masa sino que indica además un cambio de forma. (Figuras y resultados facilitados por Gonzalo Durante).

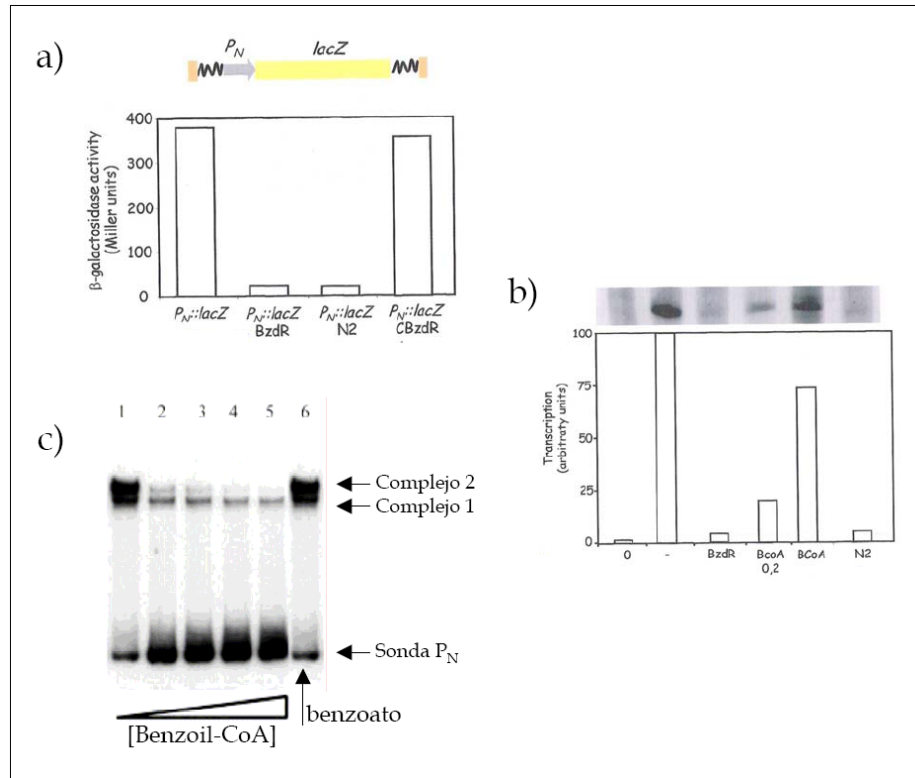
Acción del efector benzoil-CoA

Figura IV.24. a) Ensayo de actividad de la beta-galactosidasa en un experimento de fusión del promotor P_N con $lacZ$ en presencia de BzdR, N-BzdR y C-BzdR. b) Ensayo de transcripción *in vivo* en cepas con BzdR y N-BzdR en presencia o ausencia de Benzoil-CoA. (Figuras y resultados facilitados por Gonzalo Durante). c) Gel de retardo de migración de complejos nucleoproteicos [P_N -BzdR] (pocillo 1) y de éstos en presencia del efector benzoil-CoA en concentración creciente de los pocillos 2 al 5 (de 250 μ M a 2mM) y en presencia de un análogo del benzoil-CoA no funcional: el benzoato. Las flechas indican las bandas correspondientes a la sonda libre y a los dos complejos específicos [P_N -BzdR] "1" y "2", de mayor y menor movilidad que se ven afectados por la presencia del efector. (Figura extraída de Barragán *et al*, 2005).

Experimentos de transcripción *in vitro* e *in vivo* confirman que BzdR es un represor que ejerce una represión equivalente a la del dominio N-terminal por sí sólo, y demuestran que la presencia del efector Benzoil-CoA anula el efecto represor de BzdR (Figuras IV.24b y IV.24c), inhibiendo la unión de BzdR al ADN, lo que se deduce de la disminución significativa de la banda del complejo [P_N -BzdR] "2" en presencia de benzoil-CoA (Figura IV.24b). La banda del complejo "1", de mayor movilidad, no llega a

desaparecer, lo que indica que en presencia de Bz-CoA, BzdR no se despegaba de todos los sitios. Estos resultados parecen indicar que es el complejo “2” el encargado de la represión. El mecanismo por el que la benzoil-CoA inhibe la función represora de BzdR y la estructura de los complejos ([ADN-BzdR_x] y [ADN-BzdR_x-BzCoA]) se desconoce, y el objetivo de la caracterización mediante AFM era el de aportar información estructural de alta resolución que contribuyera a la comprensión de dicho mecanismo de acción.

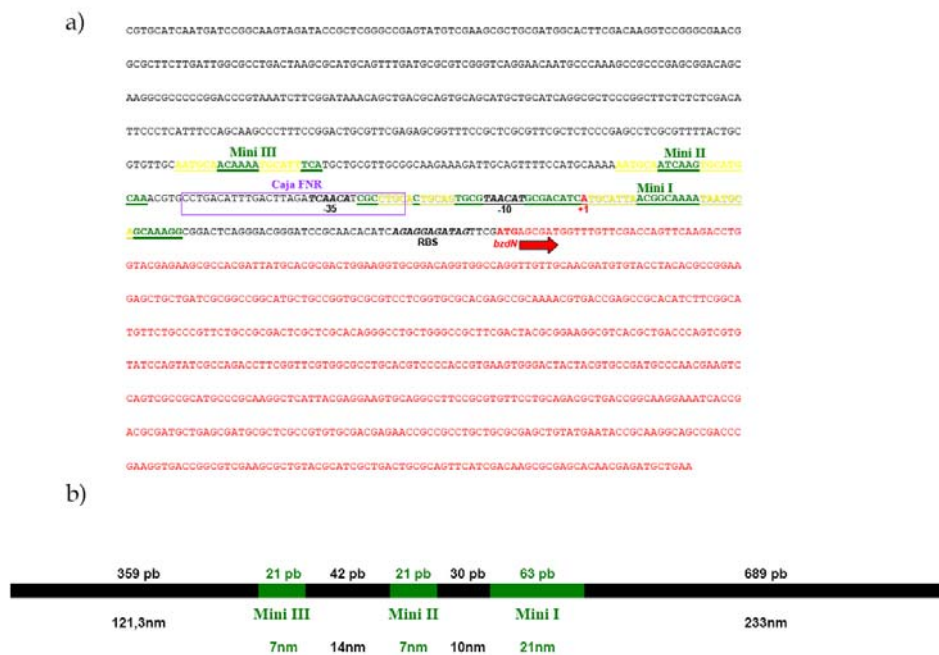


Figura IV.25. Sonda “P_NL” para experimentos de AFM (1225 pb; 414 nm). **a)** Sonda de ADN obtenida por PCR usando como molde el plásmido pCOR7, que incluye el gen BzdR, el promotor P_N y el gen *bzdN*. Se amplificó una región de 1225 pb con los oligonucleótidos 3REG (5'-GGGGTACCCGTGCATCAATGATCCGGCAAAG-3') y N3' (5'-TTCAGCATCTCGTTGTGCTC-3').

b) Esquema del fragmento donde se indican el número de pares de bases y su correspondencia en nm de cada caja de unión de BzdR y su distancia a los extremos.

Planteamiento de los experimentos de AFM

Las preguntas que se buscaba resolver con los experimentos de microscopía de fuerzas atómicas fueron:

1. Cuál es la estructura del complejo formado por P_N con BzdR, y si existe más de una estructura específica para este complejo.
2. Qué cajas son necesarias para formar esta estructura.
3. Cuál es la estequiometría del complejo, y más concretamente: Cuántos dímeros de BzdR ocupan el sitio de unión I.
4. Cuál es el efecto a nivel estructural de la Benzoil-CoA. (Y si se confirma que su análogo Benzoato no es activo como inhibidor de la función represora de BzdR).

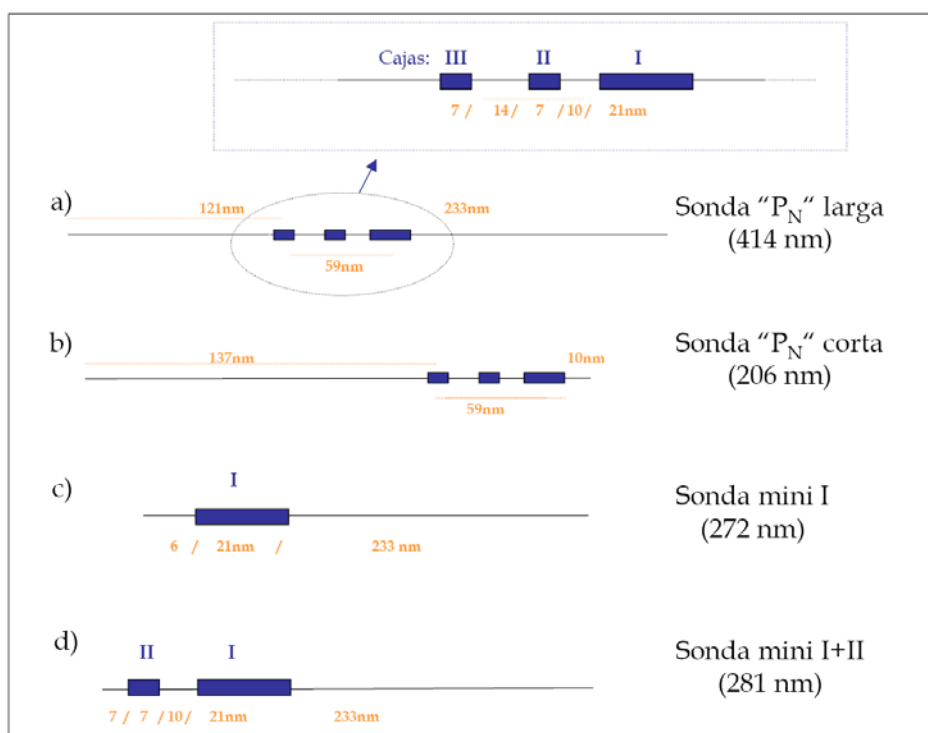


Figura IV.26. Sondas empleadas: **a)** P_N larga, **b)** P_N corta, **c)** mini I, **d)** mini I+II, que contienen respectivamente los tres sitios de unión (P_N larga y P_N corta), el sitio I (mini I) y los sitios I y II (mini I+II).

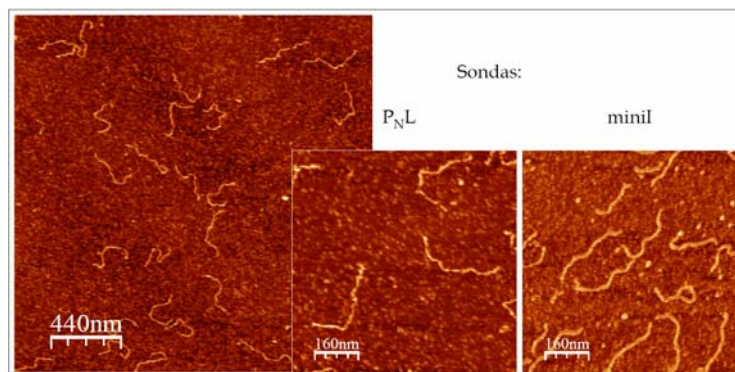


Figura IV.27. Ejemplo de dos campos con las sondas P_{NL} (413 nm) y miniL (260 nm).

Las condiciones utilizadas en la formación de los complejos y de preparación de las muestras de AFM se especifican en los apartados III.3 y III.4.B del capítulo III de Materiales y Métodos.

IV.3.2. Resultados

En la caracterización de las muestras de complejos incubados con BzdR y la sonda P_{NL} (aquella que contiene los tres sitios de unión en su secuencia), se obtuvo un conjunto de complejos heterogéneo, compatibles con la distinta ocupación de los sitios.

En las **Figuras IV.28 y IV.29** se muestran ejemplos de complejos en los que es posible afirmar que BzdR ocupaba los sitios: 1, [1 y 2], [1 y 3] y [2 y 3].

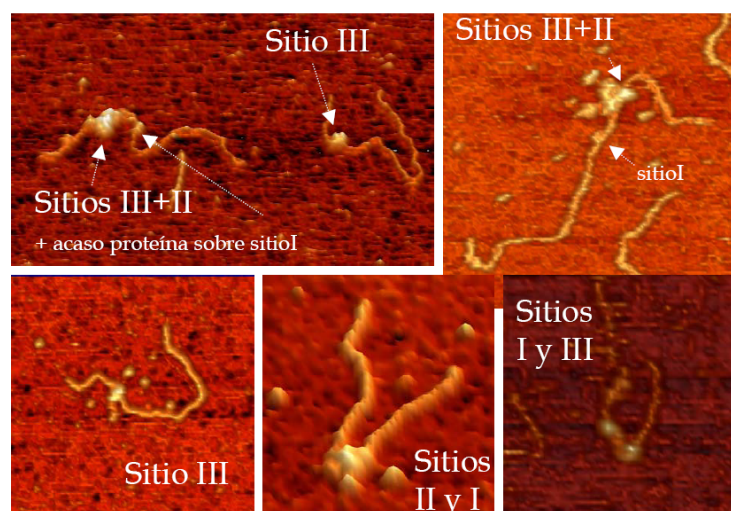


Figura IV.28. Ejemplos de complejos lineales con distinta ocupación de los sitios.

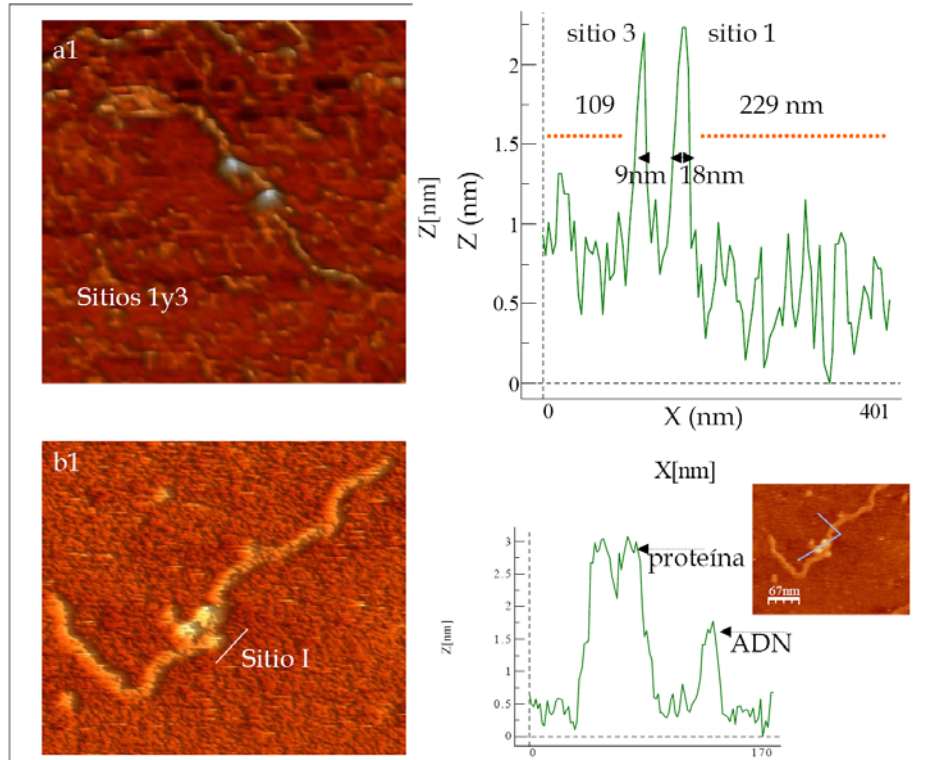


Figura IV.29. a1) Ejemplo de un complejo con proteína ocupando los sitios 1 y 3. El perfil de la cadena del complejo (**a2**) muestra las distancias de las proteínas a los extremos del fragmento (siendo los esperados 121 y 233nm) y el ancho de las mismas a media altura (longitudes de la huella: 7 y 21nm). La punta empleada en la toma de esta imagen resultó ser más fina de lo habitual (de 6nm de diámetro según indica el perfil del ADN desnudo) lo que permitió resolver con mayor fiabilidad los dímeros de BzdR en el complejo. **b1)** Ejemplo de un complejo que parece mostrar dos dímeros de proteína en el sitio 1. El perfil **b2**, trazado como representado en la figura del recuadro, muestra la diferencia de alturas entre ADN y proteína de ~1,25 nm.

Además se encontró una estructura más compacta (**Figura IV.30**), bastante frecuente, sobre la que se realizó un estudio más profundo, buscando explicar su configuración y la posición de los distintos sitios en la misma, y su posible papel funcional.

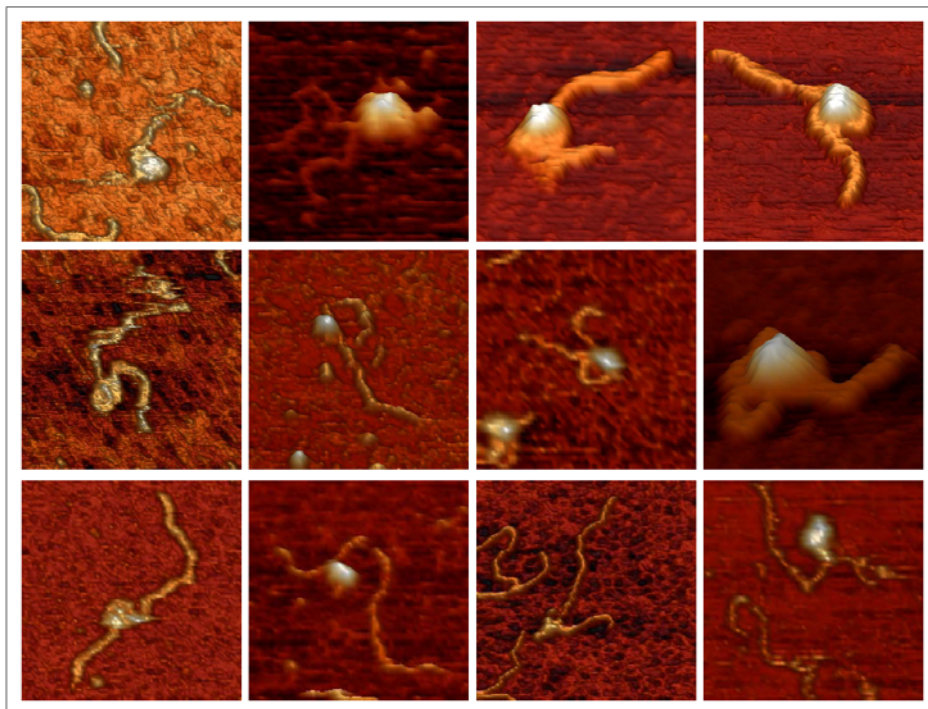


Figura IV.30. Ejemplos de complejos con estructura compacta.

Mientras la altura promedio de la proteína en los complejos lineales era de $1,2 \pm 0,2$ nm ($N=12$) sobre la altura de la cadena de ADN, la de estas superestructuras era de $2,3 \pm 1,1$ nm ($N=14$).

La longitud de los brazos emergentes en estos complejos es de $108,9 \pm 20$ nm y $199,9 \pm 44,2$ nm ($N=16$), algo menor que los esperados para la distancias medidas entre los extremos de la sonda y el comienzo de los sitios 3 y 1 (121 nm y 233 nm respectivamente).



La longitud total se reduce un 18% en promedio si se mide la extensión de una supuesta estructura tipo horquilla, como la propuesta para el sistema anterior de TodT. Sin embargo, la longitud del perfil trazado en forma de lazo en torno a la proteína (como el indicado en la **Figura IV.31a**) lleva a un valor compatible con los 414 nm esperados ($398,6 \pm 28,9$ nm) ($N=14$). Suponiendo que en esta configuración el ADN abraza el cúmulo de proteína se midió el perímetro del lazo en 14 complejos. Lo que dio lugar a un promedio de $99,4 \pm 14$ nm que contendría los tres sitios.

El ancho a mitad de altura de estas superestructuras (medido como descrito en la **Figura IV.31.b2**) es de 26 ± 6 nm ($N=10$) lo que da lugar a un volumen (de casco de esfera, **Figura IV.31b3**) que acepta 5 dímeros (exactamente 5,3 veces el volumen de un dímero calculado como un cilindro con las dimensiones resueltas por microscopía electrónica).

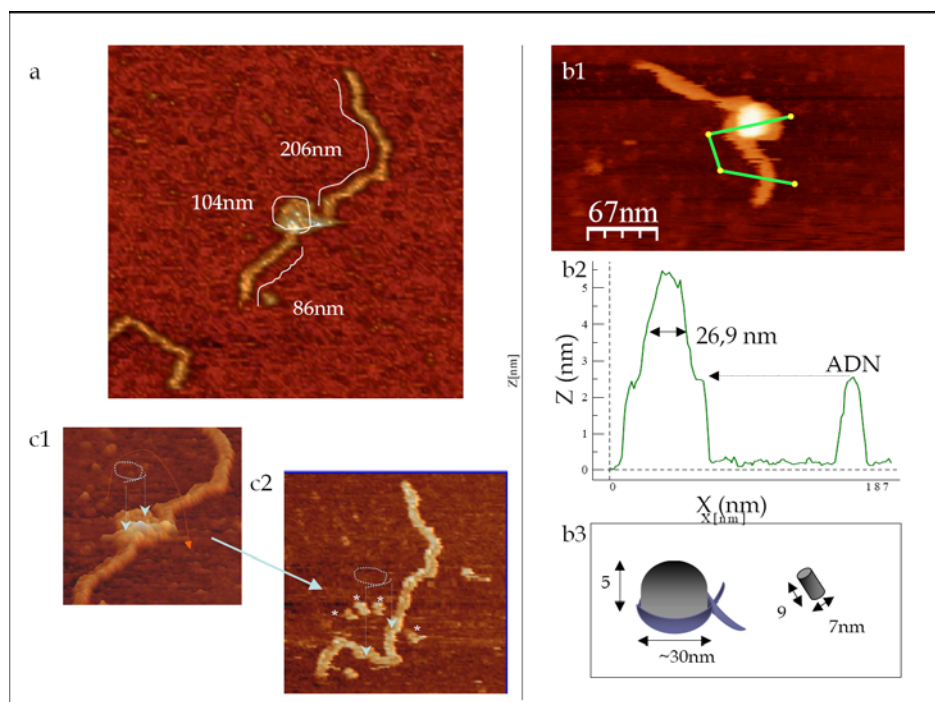


Figura IV.31 Complejos que presentan una superestructura. **a)** Imagen de uno de estos complejos donde se especifican las dimensiones de los brazos de ADN. **b)** Estudio del volumen de la superestructura. **b2** muestra el perfil trazado en **b1** y las dimensiones de la superestructura. **b3** muestra el casco de esfera al que se aproximaría el volumen del conjunto y un cilindro con las dimensiones resueltas por ME para un dímero de BzdR. **c)** las estrellas indican los posibles dímeros de BzdR separados del ADN al deshacer el hipotético bucle de **a)**. Sus dimensiones no pueden ser resueltas al ser menores que el diámetro efectivo de la punta, pero sí son coherentes entre sí ($\sim 17\text{nm} \times \sim 9\text{nm}$ y 3nm de alto).

Estos resultados permiten proponer el modelo que presentaré en la discusión que sigue.

Las muestras de complejos formados con la sonda “mini I+II” también contenían superestructuras algo menos voluminosas (**Figura IV.32**) e igualmente coherentes con una configuración del ADN en bucle.

Buscando resolver el número de dímeros que se unen al sitio I se analizaron los complejos formados por BzdR con la sonda mini I, contenedora de tan sólo el sitio I. En la **Figura IV.33** se muestran complejos con todo el sitio I recubierto sin posible distinción entre dímeros (**a**), con dos dímeros separados (**b**) y dos contrapeados (**c**) e incluso con un agregado de proteína en el extremo de la sonda formado por interacción proteína-proteína, como los observados en los experimentos de UCA y electroforesis. De esta forma no ha sido posible resolver la ocupación del sitio I.

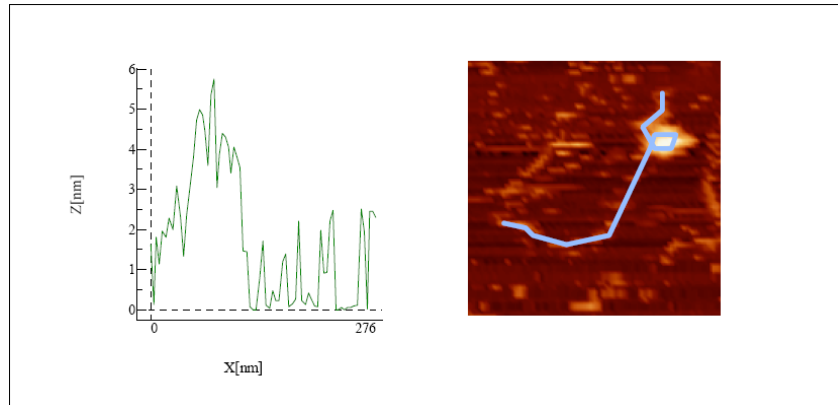


Figura IV.32. Ejemplo de complejo formado con la sonda mini I+II (281nm) y esquema del perfil con forma de bucle trazado sobre el mismo.

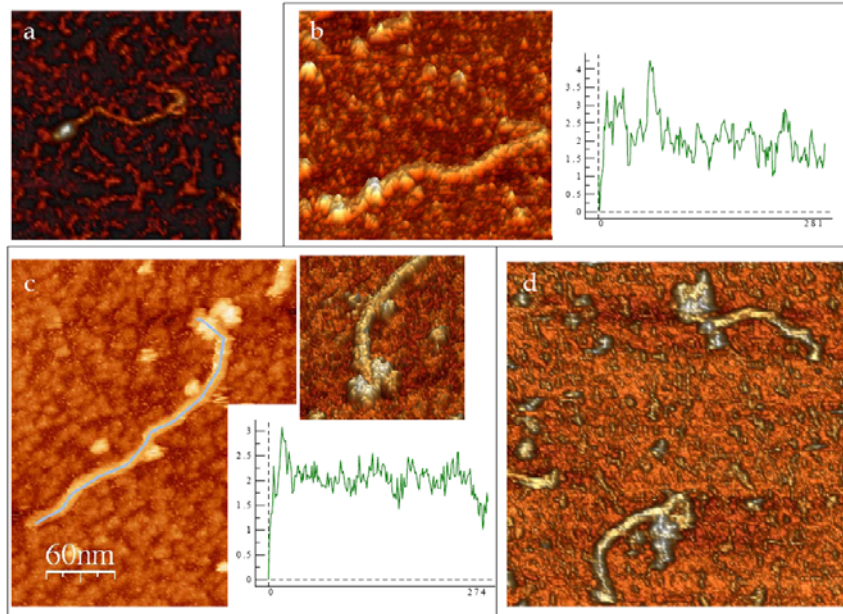


Figura IV.33. Ejemplos de complejos formados con la sonda mini I

A continuación se estudió el efecto sobre estos complejos de la Benzoil-CoA, efector de la activación de la transcripción, y de su análogo Benzoato, no funcional y usado como control negativo. Mientras que el número de complejos y la aparición repetida de las superestructuras se mantenía invariable al incubar la sonda P_NL y BzdR (1:42) en presencia de Benzoato 2mM (**Figura IV.34b**), al añadir BzCoA 2mM se apreció una disminución del número de complejos, en especial de los complejos que presentaban una superestructura (**Figura IV.34c**). Las figuras **IV.34 c2** y **c3** muestran dos ejemplos encontrados de estas últimas. Si bien no es un resultado cuantitativo, sí es un resultado que apoya el modelo que discutido más adelante.

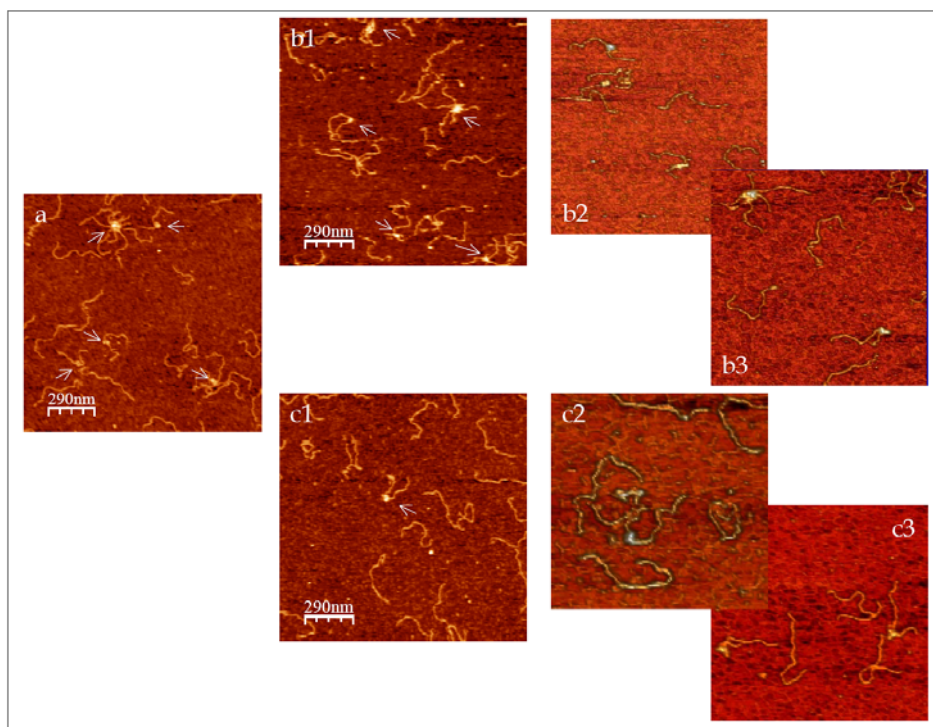


Figura IV.34. Complejos [P_NL-BzdR] (1:42) incubados en tampón T (**a**), y en presencia de Benzoato 2mM (**b**) y de BzCoA 2mM (**c**). Las flechas en las imágenes más amplias señalan complejos con proteína. Las imágenes b2, b3, c2 y c3 muestran ejemplos de los complejos encontrados en ambas muestras.

IV.3.3. Discusión.

Regulación del operón *Bzd*

Los datos bioquímicos presentados en la introducción apuntan a la presencia de un plegamiento importante del ADN y a la formación de una superestructura. Así lo reflejan el patrón complejo de hipersensibilidades observadas en los ensayos de *footprinting* al aumentar la concentración de BzdR (**Figura IV.23a**) y las tres bandas encontradas en los experimentos de retardo (**Figura IV.23b**). La caracterización estructural con AFM ha permitido verificar la formación de esta superestructura (**Figura IV.30**). A pesar de que la proporción de complejos con esta configuración es escasa hay motivos para pensar que es un resultado relevante. Por un lado la estructura es muy reproducible. Por otro lado, las condiciones de formación de complejo empleadas no garantizaban una gran representación de esta superestructura (condiciones semejantes a las del tercer carril del retardo de la **Figura IV.23b**). Además el porcentaje de complejos observables por la técnica (adheridos y conservados sobre la superficie de la mica) no es el que se da en solución sino muy inferior (como será discutido en el capítulo V, de Discusión) (Sorel *et al.* 2006).

Los resultados de los ensayos de transcripción *in vitro* e *in vivo* manifiestan que el activador (AcpR) y el efector (BzCoA) son imprescindibles para que se dé la transcripción desde el promotor P_N en presencia del represor (BzdR).

Se ha descrito que el **activador** es necesario para el reconocimiento del promotor y para la formación del complejo abierto, presumiblemente por estabilización de la interacción ADN-ARNp. Su sitio de unión solapa parcialmente con el del sitio I del represor, y queda confinado por el otro extremo por el sitio II (**Figura IV.19b**). Compite por tanto con el represor por una región del ADN común, siendo el represor el que prevalece a igual concentración de ambos. El represor presenta una afinidad máxima por su secuencia de unión más distante o extrema del sitio I, y una afinidad mínima por la secuencia de unión también del sitio I más cercana al sitio II, siendo la última en ocuparse, justo la que solapa con el sitio de unión del activador.

Por otro lado se ha descrito que el **efector** (Benzoil-CoA) es necesario para inhibir la acción represora de BzdR. Se desconoce, sin embargo, el mecanismo de esta inhibición.

N-BzdR, el mutante de la proteína con sólo el dominio N-terminal, con una afinidad por el ADN un poco inferior que la de BzdR resulta ser un represor 100% funcional. Sin embargo carece de un bolsillo de unión del

efector Benzoil-CoA y no advierte su presencia, con lo que su represión es irreversible. Es decir que N-BzdR es un “super-represor”.

Esto parece indicar que la represión tiene lugar por oclusión del promotor P_N (**Figura IV.19**), de sus cajas -10 y -35 de reconocimiento de la ARNp (dentro del sitio I de unión de la proteína BzdR) y de la secuencia de unión del activador AcpR (que también solapa parcialmente con la del sitio I), necesario para que se inicie la transcripción. Por tanto: la hipótesis de partida sobre el funcionamiento del efector (el Bz-CoA) le atribuía el poder de separar la proteína del ADN al unirse a BzdR e inducir un cambio conformacional de esta proteína. Sin embargo la disociación del complejo en presencia de Bz-CoA no es total. Los ensayos de retardo muestran una banda residual correspondiente al complejo cuando se incubaba con un exceso de efector, y los experimentos equivalentes de AFM mostraban igualmente complejos, eso sí, con una disminución aparente del número de superestructuras.

Según esto, el sitio I sería ya suficiente para ejercer la represión (por oclusión) y para que esta represión (y con ella: la transcripción del promotor) fuera regulable con la acción del efector. Sin embargo, los resultados bioquímicos no confirman esta hipótesis. Se analiza a continuación la función de los distintos sitios de unión del represor.

La sonda “mini I” con sólo el *sitio I* ya presenta represión plena en presencia de BzdR, lo que indica que la sola oclusión de esta región que incluye las cajas de la polimerasa ya es suficiente para la represión. No obstante, los ensayos de transcripción *in vitro* con esta sonda muestran que la presencia de BzCoA no logra des-reprimir el sistema. (Otro resultado que contradice la hipótesis inicial sobre el efector como agente separador del complejo).

La sonda *mini I+II* (sin el sitio III), sin embargo, sí se comporta igual que la sonda nativa, P_N , en los ensayos de transcripción *in vitro*: en presencia de AcpR se da la transcripción, y ésta es reprimida en presencia de BzdR y reactivada al introducir BzCoA en el medio. Además en los ensayos de retardo de la sonda *mini I+II* con BzdR aparecen tres bandas equivalentes a las de los retardos de la sonda con los tres sitios, **Figura IV.23b**). Una banda corresponde a la sonda libre. Las otras dos bandas se pueden asociar a dos complejos distintos, coherentes con los resultados de los experimentos de AFM con esta sonda, en los que se caracterizaron complejos con ocupación parcial y también formando una superestructura (**Figura IV.32**). Esto sugiere que los sitios II y III (o quizás ya sólo el III) intervienen entonces en la dinámica del proceso.

Los resultados estructurales obtenidos junto con el cuerpo de resultados bioquímicos previos presentados en la introducción de este

capítulo son compatibles con un modelo que acepta la participación de esta superestructura en el mecanismo de regulación y que discuto a continuación.

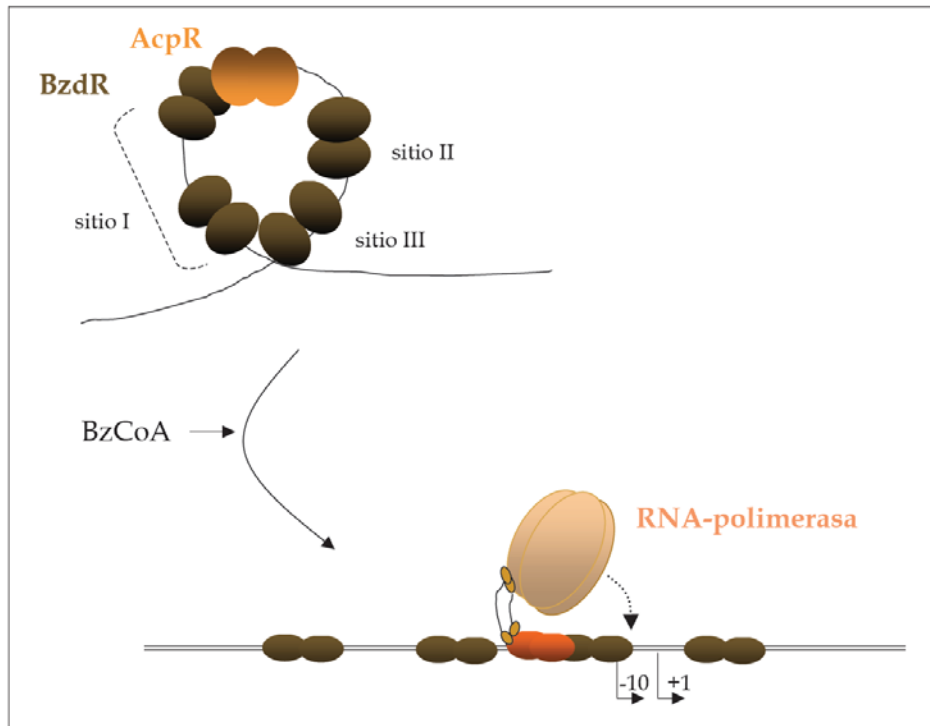


Figura IV.35. Modelo de mecanismo funcional

La **Figura IV.35.a** muestra un modelo de la configuración de la superestructura encontrada: un bucle cerrado por la interacción entre las proteínas de represor. La unión posterior del efector genera un cambio conformacional que seguramente reduzca la afinidad entre proteínas (aunque esto no ha sido demostrado) y entre proteína-ADN. Esto provoca el desplegamiento de la superestructura (**Figura IV.35b**). Entonces se revela la presencia del activador AcpR, si se encontraba oculto formando parte del bucle (como representado en la figura), o queda descubierta su secuencia de unión para que pase a ocuparla. (Los ensayos de retardo no logran demostrar de forma irrefutable la presencia de AcpR en el complejo con BzdR, pero sí apuntan hacia esta idea). En cualquier caso el activador ya es accesible a la ARNp, que, una vez unida, compite con la BzdR (aún menos afín al ADN por haber unido BzCoA) desalojándola del sitio I y comenzando la transcripción. BzdR presenta una gran tendencia a agregar y quizás se generen estructuras

aún más complejas que las descritas, con más dímeros que los directamente unidos al ADN, todavía más impenetrables, e igualmente funcionales (desarticuladas en presencia del efector por reducción de la afinidad proteína-proteína).

La función de la superestructura parece ser por tanto la de impedir la entrada del activador, o su reconocimiento por parte de la ARNp, asegurando de manera rotunda la invisibilidad del promotor P_N hasta que se vuelva necesaria la activación de la ruta catabólica de compuestos aromáticos que controla. Dado que el complejo BzdR-ADN parece ser constitutivo, sólo cuando aparezca una fuente de carbonos aromáticos (y entonces se genere BzCoA) se desplegará el supercomplejo, y en caso de encontrarse la bacteria en condiciones anaeróbicas (lo que induce la dimerización de la AcpR y su unión al ADN) la ARNp podrá reconocer su promotor y, estabilizada por la AcpR, dar lugar al complejo abierto y comenzar la transcripción del *cluster bzd*, que codifica los metabolitos de la ruta.

Se trata de un sistema de regulación muy complejo y muy sutil, que cuenta con un gran número de participantes bien coordinados, y muy robusto, dadas la eficacia de la represión y la rápida respuesta ante la aparición del efector.

IV.3.4 Perspectivas

Quedan pendientes los experimentos de AFM sobre los complejos ternarios con el activador (ADN_{P_N} BzdR_x AcpR₂) que quizás desvelen la presencia de este último dentro de la superestructura (presencia no detectada en los retardos), y sobre los complejos de la sonda P_N con el mutante NBzdR para comprobar si ciertamente la superestructura se debe a la interacción proteína-proteína entre los dominios C-terminal, los que unen BzCoA, o si por el contrario el propio dominio N-terminal participa también de esta interacción.

Con este capítulo queda ilustrado cómo la información estructural de alta resolución que aporta el AFM al estudio de este tipo de sistemas es muy valiosa para entender y complementar, como una pieza de puzzle, un cuerpo de resultados procedentes de otras técnicas.

Todos los resultados bioquímicos presentados en este capítulo han sido facilitados por el estudiante de doctorado Gonzalo Durante o extraídos

de publicaciones realizadas por el grupo de investigación de Biología Medioambiental (CIB, CSIC) en el que ha realizado su tesis doctoral dirigido por los investigadores Manuel Carmona y Eduardo Díaz.

IV.4. Regulación de la transcripción en el bacteriófago Ø29

Los tres epígrafes precedentes (IV.1, IV.2 y IV.3) constituyen distintos ejemplos de aportación de la caracterización estructural de moléculas individuales proporcionada por el AFM a la comprensión del mecanismo molecular de regulación de la transcripción. Aprovecharé las discusiones de resultados anteriores para exponer el proyecto más extenso de esta tesis: la caracterización de la regulación de la transcripción en el bacteriófago Ø29 mediante AFM, concretamente del mecanismo regulador del paso de la transcripción temprana a la tardía.

IV.4.1. Introducción

El bacteriófago Ø29 es un virus que infecta de forma lítica a la bacteria *Bacillus subtilis*. Su genoma contiene al menos 20 genes, codificados en un ADN de doble banda de 19285 pb (~6,5 µm), representado en la **Figura IV.36**. La expresión del genoma tiene lugar en dos estadios: el “temprano” y el “tardío”.

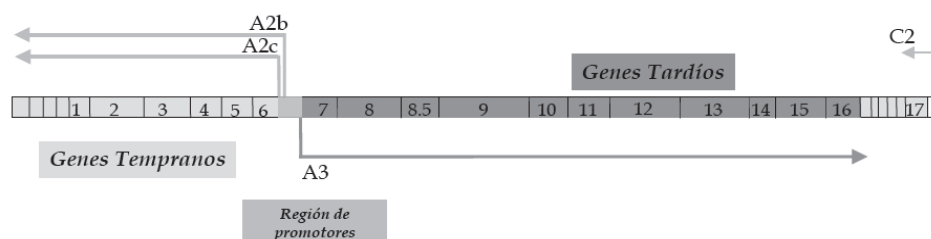


Figura IV.36. Mapa del genoma de Ø29. Se indican los principales promotores desde los que se transcriben los genes tempranos (representados en gris claro) y los tardíos (en gris oscuro).

Tras la absorción del virus en la membrana bacteriana (**Figura IV.37**) el genoma es inyectado y recluta la ARN-polimerasa bacteriana iniciándose la transcripción del material genético desde los llamados “promotores tempranos” A2c y A2b (**Figura IV.37b**). Los genes tempranos codifican las proteínas p1, p2... hasta p6, todas ellas involucradas en la

replicación del genoma (concretamente la p2 es la ADN-polimerasa) y en la regulación de la transcripción (que requiere de las proteínas p4 y p6).

Una vez que p4 y p6 han sido sintetizadas tiene lugar un cambio en el sentido de la transcripción: el promotor A3, “**promotor tardío**”, es activado mientras que los promotores A2c y A2b son reprimidos (**Figura IV.37c**). Se transcriben entonces los genes tardíos que codifican proteínas sólo necesarias para la morfogénesis del virus y la lisis de la bacteria, *i.e.* proteínas estructurales de la cápsida del virus, de la maquinaria empaquetadora del ADN y de las proteínas encargadas de la lisis final de la membrana bacteriana (precisamente: el gen 14 codifica la “holina” y el gen 15 la “lisozima”). Todas ellas son inútiles e incluso letales durante las primeras etapas de la infección. (Meijer *et al.*, 2001)

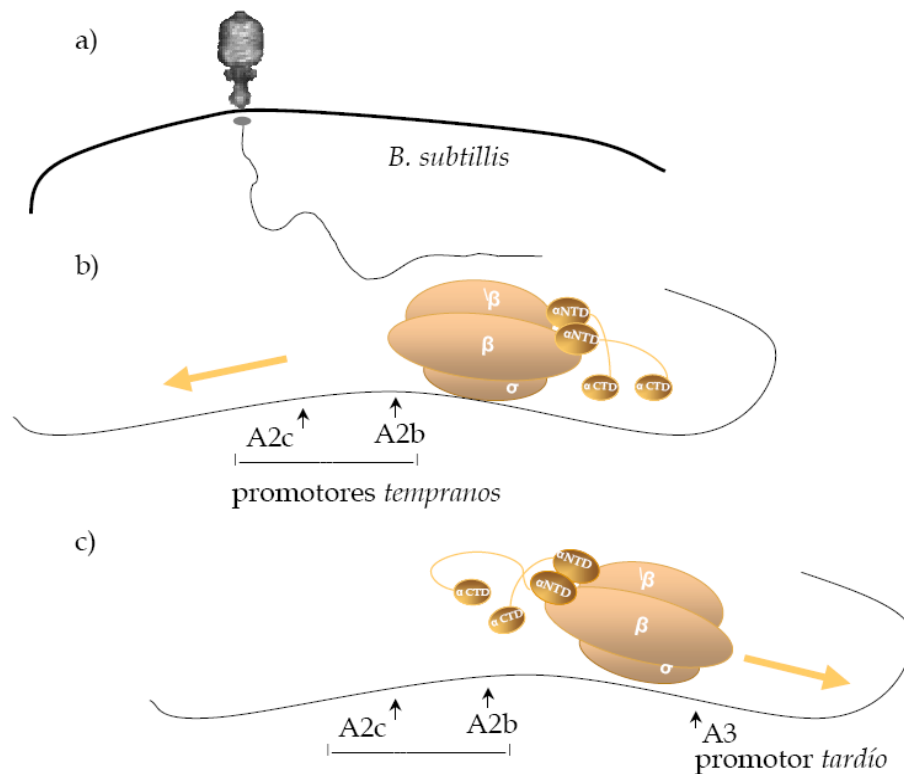


Figura IV.37. Representación esquemática de la infección de la bacteria *B. Subtilis* (a), y del sentido de lectura de la ARN-polimerasa bacteriana en las etapas de transcripción temprana (b) y tardía (c) a partir de los promotores.

Se determinó mediante ensayos bioquímicos la formación de un complejo nucleoproteico [ADN p_{4x} p_{6y}] regulador y su participación directa en el mecanismo que organiza temporalmente la expresión de los genes del fago. En el presente trabajo se caracteriza mediante AFM la estructura de este complejo nucleoproteico regulador de la transcripción.

Precedentes bioquímicos y estructurales

La **proteína p4** (~15 KDa) es un factor transcripcional específico de secuencia que se une en forma de homodímero a cuatro sitios agrupados en dos regiones, intercaladas entre los tres promotores (**A2c**, **A2b**, **A3**), como se representa en la **Figura IV.38a** (Camacho y Salas, 2001a, 2004). Los sitios 1 y 3 de unión, por los que p4 muestra mayor afinidad, solapan con las secuencias de las cajas “-35” de los promotores tempranos. De esta forma, p4 compite con la ARN-polimerasa inhibiendo parcialmente la transcripción desde ambos promotores (Mendieta *et al.*, 2007).

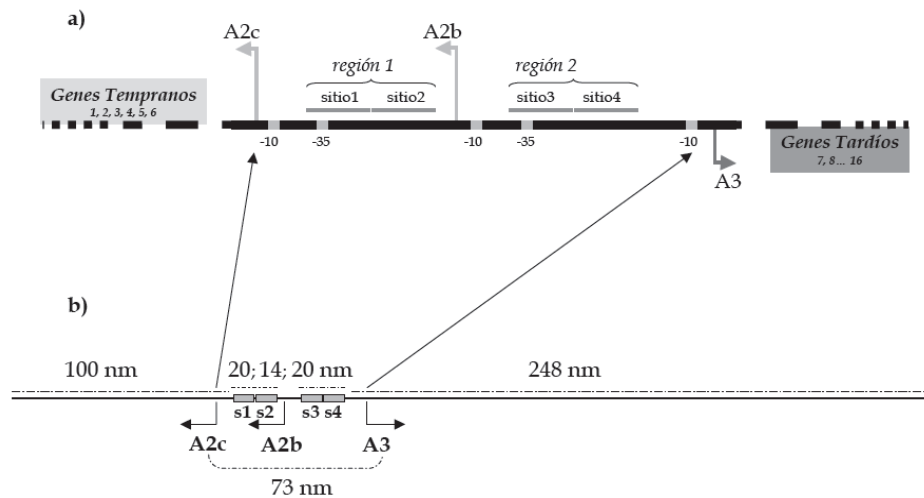


Figura IV.38. a) Esquema de la región de los promotores. Los promotores tempranos, A2c y A2b, y el tardío, A3, se encuentran agrupados en una región de 219 pb. **b)** Esquema del fragmento empleado para el AFM. Se trata de un fragmento de 1189 pb y ~402 nm de longitud (calculada a partir del número de pb: 0.338 nm/pb), que contiene la región de los promotores situada asimétricamente respecto de los extremos. (La metodología de obtención y purificación se detalla en el capítulo III, de Materiales y Métodos, apartado 3.1).

La **proteína p6** es una proteína nucleoidea (~12 KDa) que se une con baja afinidad, sin especificidad de secuencia y en forma de dímero a todo el genoma. Además, se une a la región de los promotores A2b, A2c y A3 sinérgicamente con p4, formando un complejo multimérico donde el dímero de p4 del sitio2 es desplazado (resultado de ensayos de *footprinting*). (Camacho y Salas, 2001, 2004).

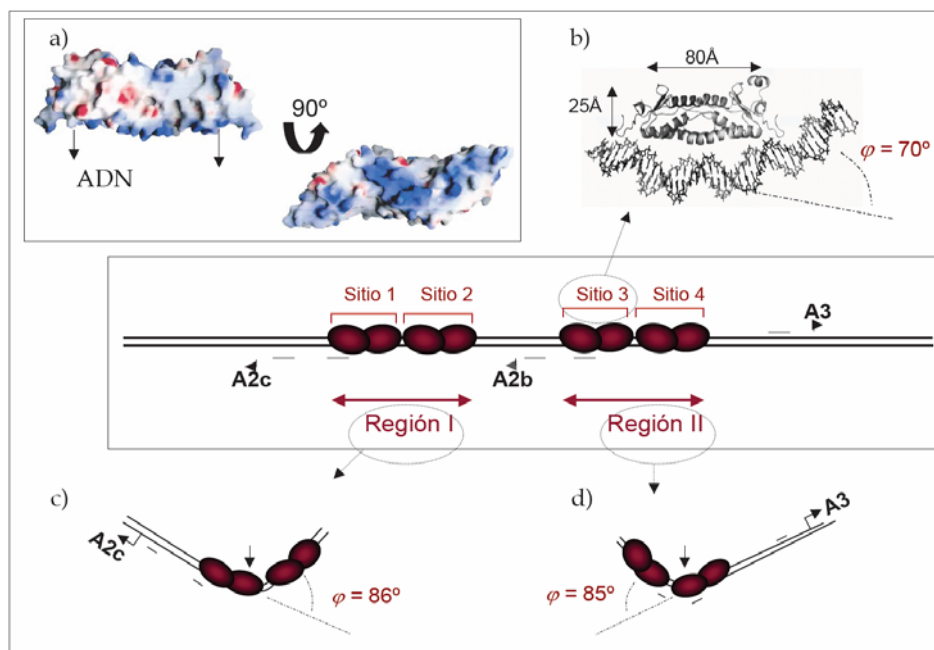


Figura IV.39. Datos estructurales anteriores sobre los complejos [p4x-ADN] **a)** Representación de la superficie electrostática del dímero de p4. La región de interacción con el ADN es rica en residuos cargados positivamente (en azul). **b)** Estructura resuelta por difracción de Rayos X del complejo cocrystalizado de un dímero de p4 unido a un fragmento de ADN con la secuencia del sitio 3 de unión de p4, [ADN_{sitio3}-p4₂], induciendo un ángulo de 70° (Badía *et al.*, 2006). **c)** y **d)** muestran los ángulos inducidos por p4 en dos fragmentos distintos de ADN que contienen cada uno una única región de unión, resueltos por experimentos de Permutación Circular. Los valores promedio de las regiones I y II fueron: 86° y 85° respectivamente (Pérez-Lago *et al.*, 2005a; Rojo *et al.*, 1990). Las flechas señalan los centros de curvatura localizados por esta técnica.

Estudios previos realizados por cristalografía de Rayos-X sobre la estructura de los **complejos [p4x-ADN]** (de unión específica) habían descrito que cada dímero flexiona la cadena de ADN al unirse a su sitio (Badía *et al.*, 2006). Experimentos de Permutación circular demostraron que p4 provoca un ángulo mayor al unirse a un fragmento de ADN con la secuencia de dos sitios de unión contiguos (región I: Pérez-Lago *et al.*,

2005a; y región II: Rojo *et al.*, 1990). El dominio de reconocimiento del sitio de unión de p4 es una subestructura tipo garfio en el extremo N-terminal, *N-hook*, que se inserta en el surco mayor de la doble hélice (**Figura IV.39b**). La curvatura inducida (cóncava en este caso) permite que los dominios de las dos p4 del homodímero contacten simultáneamente el ADN en dos puntos separados por tres vueltas de la hélice (~10 nm). (Mendieta *et al.*, 2007).

Esta curvatura inducida sobre el ADN podría estar relacionada con el mecanismo interruptor del paso de la transcripción temprana a la tardía. Existen varios ejemplos en los que se observa que la configuración angular inducida por un factor de transcripción es la efectora de un cambio o la responsable de la regulación: el de TtgV de *Pseudomonas Putida* (del capítulo IV.1), y los complejos de los factores: Hu (Kar *et al.*, 2001; Semsey *et al.*, 2002; van Noort *et al.*, 2004), IHF (Seong *et al.*, 2002; Dame *et al.*, 2005) y Fis (Zhang *et al.*, 2004) de *E. coli*.

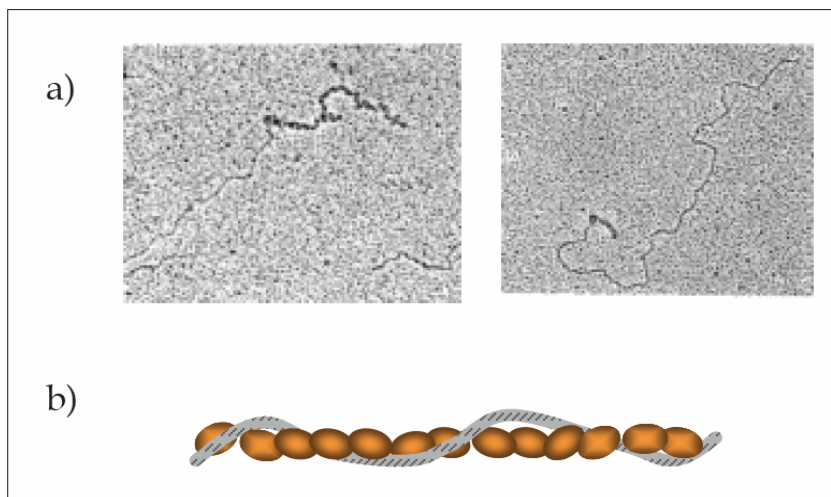


Figura IV.40. Datos estructurales de partida sobre los complejos [p6_n-ADN] **a)** Micrografías de complejos formados por un fragmento de 6,1 kbp del extremo del genoma de Ø29 y p6, y fijados con glutaraldehído (Prieto *et al.*, 1988). La polimerización de p6 inicia en el extremo, presumiblemente partiendo de la proteína terminal p3, presente en la incubación, como punto de nucleación. **b)** modelo inducido de los resultados de UCA (Abril *et al.*, 1997) por el que el ADN envuelve un filamento proteico de p6, siguiendo un superenrollamiento positivo (Alcorlo *et al.*, 2009).

La información anterior sobre los **complejos [p6-ADN]** procede de experimentos de ultracentrifugación analítica (UCA) (Abril *et al.*, 1997; Alcorlo *et al.*, 2009) y de microscopía electrónica (Prieto *et al.*, 1988; Serrano *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1994; Abril *et al.*, 1999). Mediante ambas técnicas se ha observado que a altas concentraciones de proteína (~10 µM) se forman polímeros **[p6_n-ADN]** en los extremos del genoma (**Figura**

IV.40), y que la proteína forma filamentos por sí misma (Abril *et al.*, 1999). p6 parece unirse como dímero por interacción con el surco menor del ADN y con una periodicidad de 12 pb por monómero (Freire *et al.*, 1994).

Estudio estructural de moléculas individuales realizado mediante AFM

Los siguientes pasos consistían en resolver la estructura del complejo [p4_x-ADN] con un fragmento de ADN que contuviera los cuatro sitios de unión de p4, la estructura del complejo ternario con p4 y p6, y la del complejo cuaternario (en presencia adicional de la ARN-polimerasa). Estas estructuras resultan imposibles de cristalizar y muy complicadas de analizar por técnicas de *bulk*, y por ello convenía pasar a las técnicas de moléculas individuales ("single molecule"). Además con esta aproximación se podrían detectar diversas poblaciones conformacionales, composicionales y estequiométricas en caso de estar presentes en las muestras, y complementar los datos de promedios poblacionales con elementos individuales de la distribución. La microscopía de fuerzas atómicas es una técnica adecuada para este estudio, dada su ya mencionada alta relación señal/ruido (con respecto a la de la microscopía electrónica), dado también el pequeño tamaño de las proteínas (en el límite de resolución de la ME por mezclarse con el ruido intrínseco del agente de contraste) y la posibilidad de trabajar en medio líquido.

Planteamiento de los experimentos de AFM

Se procedió a la caracterización de los complejos nucleoproteicos en orden creciente de complejidad. Primero los complejos binarios: [p4-ADN], [p6-ADN] y [ARNp-ADN], después el ternario: [p4-p6-ADN] y el cuaternario [p4-p6-RNAP-DNA]. Se acometió paralelamente la caracterización de los complejos ternarios reguladores de la transcripción del bacteriófago Nf, un sistema análogo al de Ø29.

Todos los complejos fueron caracterizados en medio líquido, empleando los modos de operación: dinámico y de *jumping* (descritos en los apartados 1.1.4 y 1.2.5 de la introducción). Adicionalmente tres de estos complejos (el cuaternario de Ø29 y el ternario de Nf y el complejo [p6-ADN_{C2}]) fueron estudiados en aire, mediante modo dinámico, buscando una mayor resolución de la imagen. Los resultados obtenidos previamente en medio líquido, permitieron confirmar la fiabilidad de los resultados obtenidos en aire.

Los métodos seguidos en la producción y la purificación de los fragmentos de ADN de Ø29 se presentan en los apartados III.1 y III.2 del capítulo de Materiales y Métodos. Las condiciones utilizadas en la formación de los complejos y de preparación de las muestras de AFM se especifican en los apartados III.3 y III.4.4 del mismo capítulo.

IV.4.2. Resultados

Los resultados estructurales de las distintas especies se presentan a continuación por orden de complejidad.

a) ADN libre

No se observó una curvatura especial para el ADN incubado sobre la mica en ausencia de proteínas. El histograma de la **Figura IV.48a** muestra una distribución angular en fragmentos de ADN marcados en un extremo con estreptavidina, que denota la ausencia de un ángulo preferencial. Dicha distribución corresponde a los ángulos medidos en la posición en la que se sitúa el vértice de la estructura tipo horquilla observada en los complejos ternarios, como se verá más adelante.

b) [ADN-p4_x]

Se observó un catálogo entero de complejos con diversas estequiometrías, distribución de ocupación de los sitios y geometrías. Se caracterizaron complejos con 1, 2, 3 y 4 sitios ocupados, en los que eventualmente p4 induce un ángulo sobre el ADN (**Figura IV.41**). Además se encontraron algunos complejos (**Figuras IV.41i-l**) donde los ángulos inducidos en ambas regiones colaboraban en el cierre de la configuración en una suerte de horquilla.

Las dimensiones de la proteína (**Figura IV.39b**) están en el límite de resolución. No obstante, al representar un histograma de distancias entre la proteína unida y el extremo del fragmento más cercano, las posiciones más ocupadas coinciden con las regiones I y II y los máximos de la distribución coinciden con las secuencias de los sitios 1 y 3, los de máxima afinidad (**Figura IV.42**).

Las distribuciones de los ángulos medidos en ambas regiones son muy dispersas (**Figura IV.43**) lo que indica dinamismo estructural o estabilidad variable de estos complejos. Sin embargo, los valores promedio

obtenidos son compatibles con los datos previos de permutación circular (**Figura IV.39c**), con lo que se confirman estos resultados de *bulk* con los de moléculas individuales.

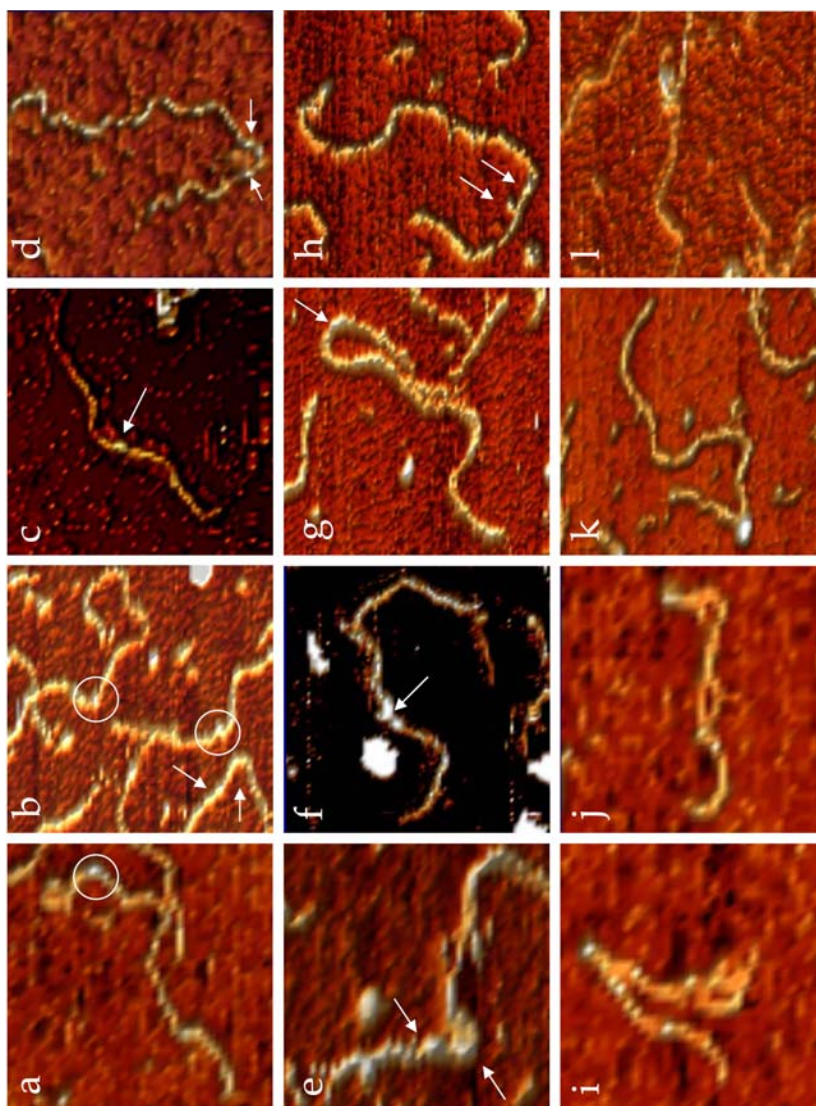


Figura IV.41 Complejos [ADN-p4_x]. Galería de imágenes de complejos con uno (**a**, **b**, **c**) dos (**e**, **f**, **g**) o más sitios (**d**, **h**) ocupados. Los complejos **i-l** son ejemplos de las configuraciones cerradas tipo horquilla encontradas en tan sólo el 12% de los complejos [ADN-p4_x] caracterizados.

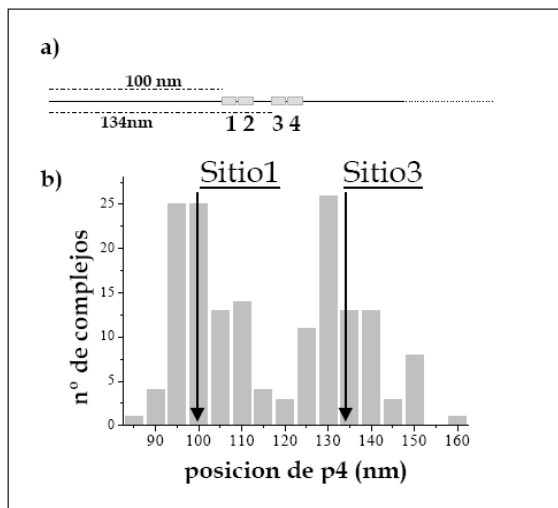


Figura IV.42. a) Esquema del fragmento de ADN indicando las distancias desde el límite de los sitios de unión de p4 y el extremo del ADN más cercano. b) Histograma de las distancias medidas en los complejos [ADN-p4x] entre el límite de un dímero de p4 y el extremo más cercano del fragmento de ADN.

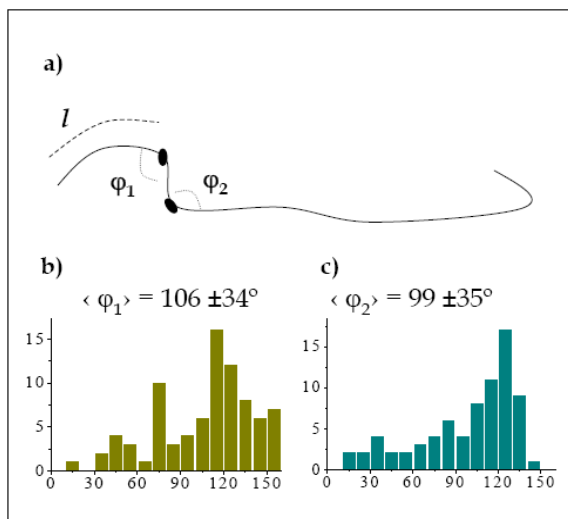


Figura IV.43. Distribución angular de las regiones ocupadas por p4 en los complejos [ADN-p4_x]. Se midieron los ángulos formados por los dos fragmentos de ADN emergentes de un sitio ocupado por p4. La dificultad de discernir entre los sitios contiguos 1-2 y 3-4 (con un Δl de 11nm, dentro del error lateral de la medida) e incluso entre los complejos con uno y dos sitios de unión contiguos ocupados llevó a su clasificación por regiones, definiendo para cada complejo los ángulos: ϕ_1 y/o ϕ_2 en función de la distancia, l , de la proteína respecto del extremo del ADN más cercano, como representado en (a). (b) y (c) muestran los histogramas correspondientes a los ángulos de ambas regiones, ϕ_1 y ϕ_2 , resultantes del análisis de 106 complejos y sus valores promedio.

c) [ADN-p6_y]

No se observó un cambio en la configuración espacial del ADN al incubarlo con la proteína hasta en una relación de 1:100 (superior a la empleada en la formación de los complejos ternarios). Tampoco se observó una localización preferente de p6 dentro del fragmento, lo que se explica con la ya descrita baja afinidad de p6 por este fragmento. Sí se detectaron en ciertos complejos un cambio en la rugosidad del ADN en franjas longitudinales, que se pueden atribuir a hileras de proteína p6 dispuestas interrumpidamente sobre el fragmento de ADN (**Figura IV.44**).

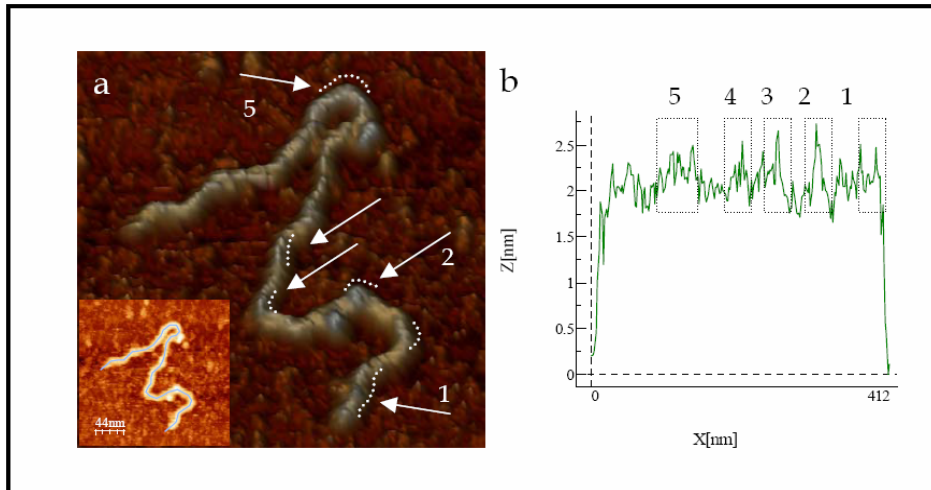


Figura IV.44 Complejos [ADN-p6_y]. **a)** Imagen de AFM de un complejo [ADN-p6_y] que muestra hileras de proteína indicadas por flechas. El perfil representado en **b)** corresponde a la línea de puntos sobre la imagen bidimensional del recuadro. Las cajas coinciden con aquellas regiones señaladas por flechas en **a)**. La barra de escala corresponde a 50nm y la escala de colores (ΔZ) a 3,4nm.

d) [ADN_{C2}-p6_y]

Los experimentos previos de caracterización estructural de los complejos [ADN-p6_y] mediante ME (Prieto *et al.*, 1988; Abril *et al.*, 1999) se realizaron con el extremo del genoma inyectado inicialmente por el fago al infectar la bacteria, que contiene el promotor temprano C2 indicado en la **Figura IV.36**. La proteína p6 presenta una afinidad máxima por esta región y actúa como represor de C2 (**Figura IV.40a**). Buscando resolver la estructura de las hileras encontradas en la región de los promotores A2b,

A2c, A3 (por la que exhibe una afinidad muy baja, ($K_d = 2.5\mu\text{M}$), sólo incrementada en presencia de p4) se incubó la proteína p6 con un fragmento de 1914 pb que contiene dicha región. La incubación se realizó a una relación ADN:proteína entre 1:50 y 1:250. Se esperaba caracterizar una estructura estable (dada la compacidad de los polímeros nucleoproteicos descritos previamente) con lo que el exceso de proteína se eliminó por purificación consecutiva de los complejos p6-ADN en un tamiz molecular (como descrito en el apartado III.4.4 de Materiales y Métodos) sin riesgo de desconfigurar el complejo con esta manipulación posterior.

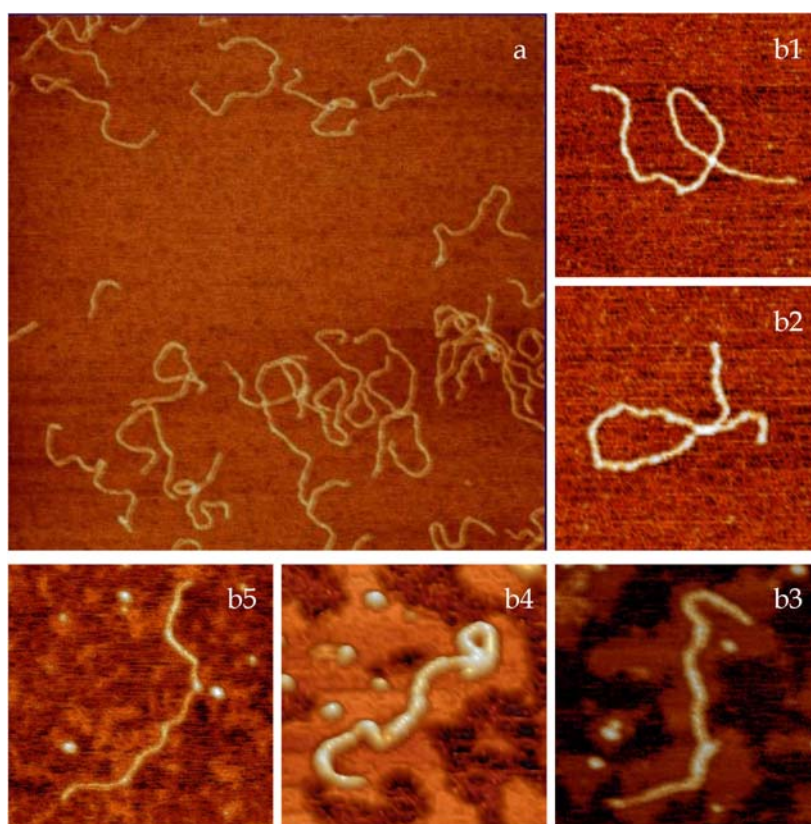


Figura IV.45. Complejos formados por p6 y el ADN_{C2} (extremo del genoma que contiene el promotor C2). Imágenes de AFM tomadas en aire de ADN_{C2} en ausencia de proteína (**a**) y de complejos con p6 (**b1-b5**). En éstas se observa la polimerización de la proteína p6 a lo largo del ADN de forma más puntual (**b3-b5**) o más continua (**b1-b2**).

Las imágenes de la **Figura IV.45** muestran hileras de proteína nucleadas de forma discontinua a lo largo del ADN. Se encontraron idénticos resultados para aquellos complejos fijados con glutaraldehído antes de su purificación en el tamiz.

Se realizó un análisis cuantitativo de los tramos de proteína polimerizada, encontrándose hileras de dimensiones variables de entre 28 y 84nm de longitud, siendo el promedio $42,4 \pm 23$ nm.

e) [ADN-ARNp_x]

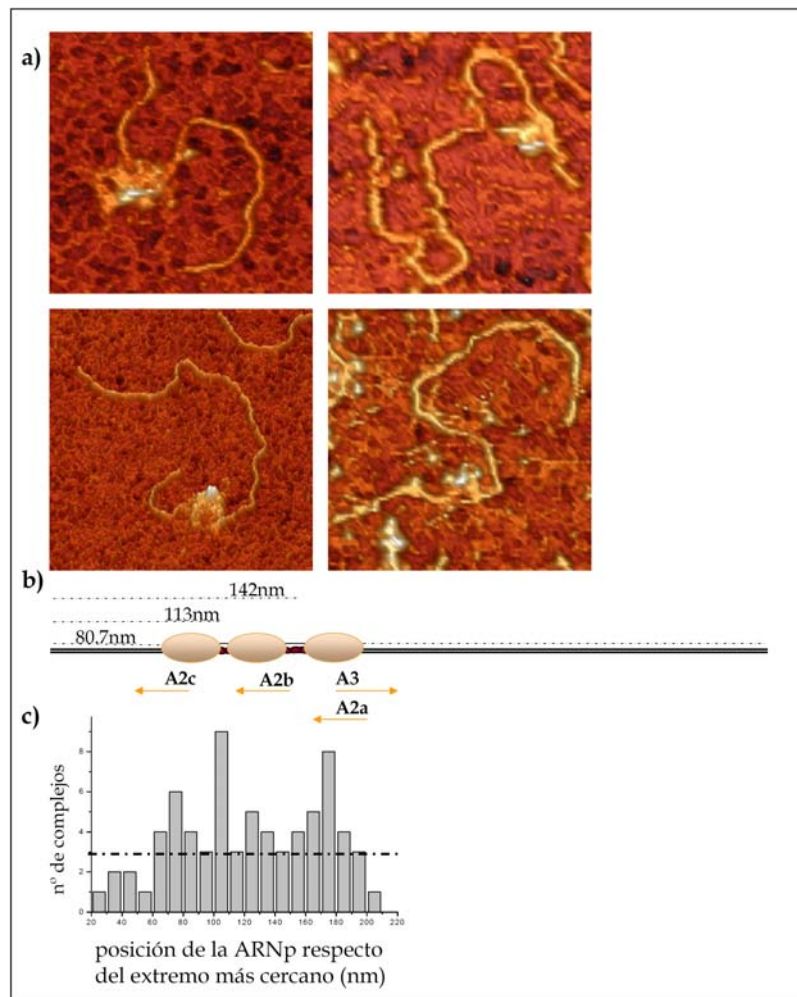


Figura IV.46. a) Imágenes de AFM en líquidos de los complejos binarios [ADN-ARNp_x]. b) Localización de la ARNp en el fragmento de ADN. Se especifican las longitudes de separación del límite de la proteína y el extremo más cercano del ADN. c) Histograma construido a partir de 75 complejos de la distancia entre las posiciones ocupadas por la ARNp y el extremo más cercano del ADN. La línea de puntos indica el nivel por debajo del cual la unión se considera inespecífica.

Los complejos [ADN-ARNp] observados resultaron ser bastante inespecíficos mostrando una distribución de la polimerasa a lo largo del ADN con máximos en la región de los promotores tempranos y sorprendentemente en una zona en la que se localiza un cuarto promotor: el A2a, un promotor débil descrito en la bibliografía (Mellado *et al.*, 1986). Esta inespecificidad es característica de los complejos ADN-ARNp, habiéndose descrito que sólo el 10% de los complejos observados por AFM es específico (Dame *et al.*, 2002).

f) [ADN-p4_x-p6_y]

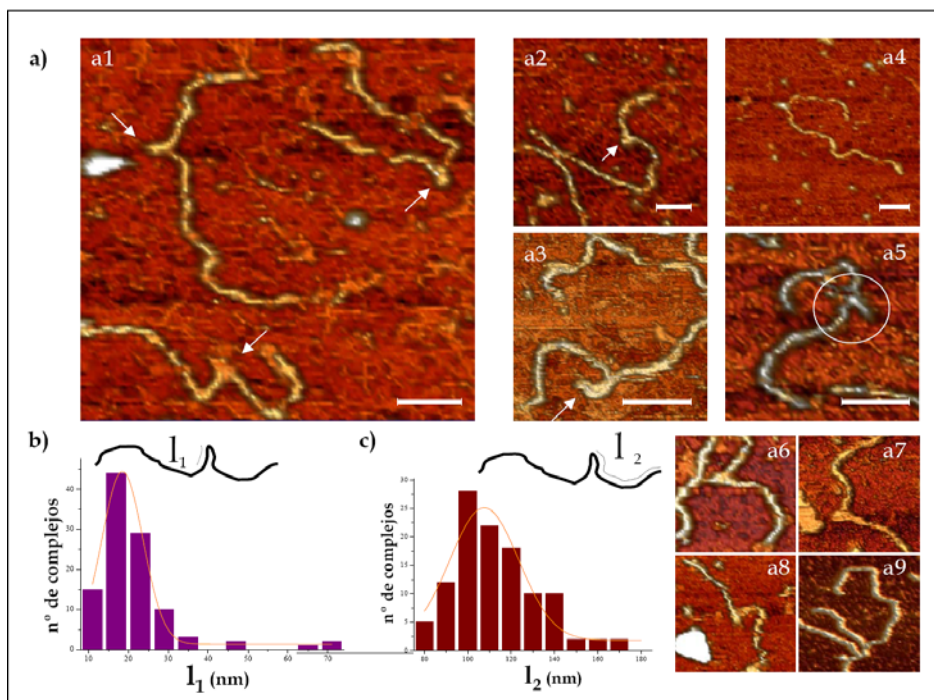


Figura IV.47. Configuración del complejo ternario [ADN-p4_x-p6_y] y localización de las proteínas en el mismo. **a)** complejos con distintas longitudes: 16, 11 y 12 nm en **a1**; 10 nm en **a2**, 32 nm en **a3**, 17nm en **a4**, 17 nm en **a5**, nm 11 en **a6**, 12 nm en **a7**, 11 nm en **a8**, 15 nm en **a9**. Las barras de escala corresponden a 50nm y la escala de colores (ΔZ) a 3,6nm. **b)** Histograma de longitudes l_1 (N=106). **c)** Histograma de distancias l_2 (N=128).

La **Figura IV.47** presenta distintos ejemplos de la estructura característica encontrada en las muestras de complejo ternario [ADN-p4_x-

p6_y]. Se trata de una conformación de tipo horquilla que pliega el ADN 180° en la región de los sitios de unión de p4. Se midieron: la longitud de la horquilla (l_1 en la **Figura IV.47b**) y la posición del vértice del mismo (*i.e.* la distancia al extremo más cercano del fragmento de ADN: l_2 en la **Figura IV.47c**).

Las longitudes de estas horquillas varían entre 10 y 43nm. El análisis de 106 complejos dio lugar a una distribución Gaussiana centrada en 18.5 ± 10.3 nm (**Figura IV.47b**). Las estructuras más frecuentes, con una longitud promedio de 17.9 ± 10 nm (ejemplo de complejo de la **Figura IV.47a2**) son similares a las encontradas en los complejos binarios [ADN-p4_x], mostradas en la **Figura IV.41.i-1**, que presentaban una longitud promedio de 13 ± 4 nm (N=13). La presencia de p6 aumenta significativamente el número de complejos con esta estructura de horquilla. Esto sugiere que p6 estabiliza las horquillas formadas por p4 al unirse a sus sitios. Además la unión de p6 produce una elongación adicional de la estructura (**Figuras IV.47a1, a3, a5**) más allá de los sitios 1 y 3 de unión de p4 (como ya había sido descrito por ensayos de *footprinting*).

La distribución gaussiana de la **Figura IV.47c** muestra que la posición del vértice de la horquilla medida en 128 complejos está centrada en 108 ± 32 nm, lo que indica que la punta de la estructura está localizada dentro de la región de los sitios de unión de p4. Midiendo la distancia al vértice desde el extremo contrario se confirmó este resultado, pues el promedio de esta distancia (288 ± 24 nm, N=15) localiza igualmente el vértice de la estructura dentro de la región de unión de p4. La longitud de contorno del ADN en estos complejos no sufría ningún cambio significativo (la distribución gaussiana construida a partir de 106 complejos está centrada en 407 ± 15 nm).

g) [ADN-p4_x-p6_y] ADN marcado con estreptavidina

La posición de la horquilla se corroboró con un tercer experimento en el que se marcó con biotina un extremo del fragmento de ADN al que posteriormente se unió estreptavidina. De la observación de los complejos ternarios formados con este ADN marcado se resolvió que efectivamente la horquilla se forma en la región de los promotores (**Figura IV.48**). Además el marcaje de estas cadenas permitió analizar la curvatura intrínseca del ADN en esta misma región (**Figura IV.48a**). Midiendo el ángulo en muestras de ADN libre se demostró la ausencia de un ángulo preferencial en esta región.

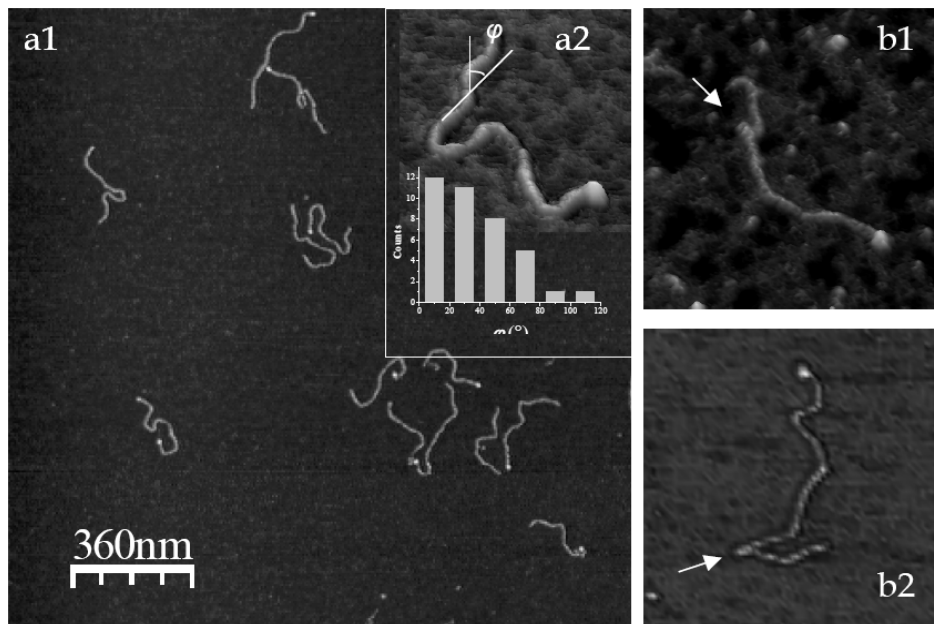


Figura IV.48 Imágenes de AFM tomadas en aire del ADN control marcado con un complejo biotina-estreptavidina (a) y de los complejos ternarios formados con este fragmento (b). El ADN se biotinilizó en el extremo de los genes tardíos y quedó marcado tras unirlos con estreptavidina. (a1) Muestra de ADN libre. (a2) Medida del ángulo del ADN en la posición promedio resuelta para la horquilla desde el extremo marcado con estreptavidina del ADN control (293nm). La distribución Gaussiana de ángulos está centrada en 0° (N=34). (b1) y (b2) muestran complejos ternarios con la horquilla característica (indicada por flechas). La relación ADN:p4:p6 fue 1:40:80.

h) [ADN-p4_x-p6_y-ARNp_z]

A continuación se analizaron los complejos cuaternarios [ADN-p4_x-p6_y-ARNp_z] (**Figura IV.49**).

Los resultados bioquímicos previos habían mostrado que el complejo ternario altera la unión de la polimerasa a los promotores permitiendo la formación de los complejos transcripcionales cerrados y abiertos en el promotor tardío, A3, e impidiendo simultáneamente la estabilización del complejo cerrado en el promotor temprano A2b y del complejo abierto en el promotor temprano A2c (Camacho y Salas, 2001a). Puesto que los complejos cuaternarios analizados se incubaron a temperatura ambiente (la transición entre los complejos cerrado y abierto tiene lugar por encima de 10°C) sólo se esperaría encontrar complejos con la ARNp unida al promotor A3.

En un primer abordaje se realizaron medidas en líquido (**Figura IV.49a-c**). Se obtuvieron imágenes poco concluyentes, dada la gran tendencia de la polimerasa a desoligomerizarse y a que su gran tamaño con respecto al de la horquilla impide identificar sin ambigüedad cada componente del complejo cuaternario. A pesar de esto, las medidas de los fragmentos emergentes del supercomplejo formado parecían concordar con una estructura de horquilla adyacente a una molécula de polimerasa, como la perfilada en la **Figura IV.49b**.

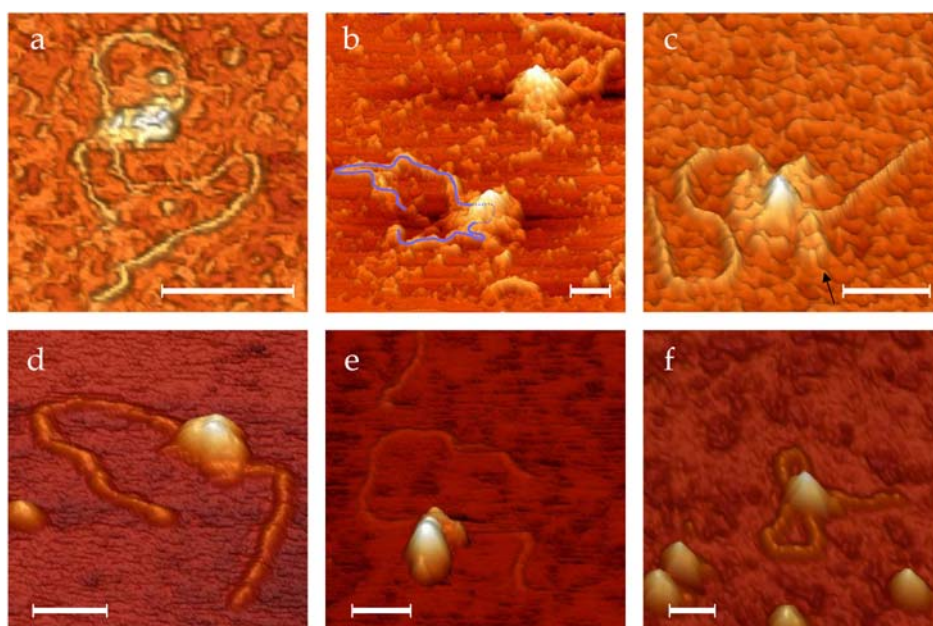


Figura IV.49 Imágenes de AFM de los complejos cuaternarios [ADN-p4_x-p6_y-ARNp_z] formados a temperatura ambiente. Las imágenes **a**, **b** y **c** se tomaron en medio líquido (tampón de imagen) y las imágenes **d**, **e** y **f** al aire. Las barras de escala corresponden a 50 nm y la escala de color de las imágenes tomadas en líquido a 7,5 nm. La línea trazada sobre la imagen **b** propone una posible trayectoria del ADN dentro del complejo, con su longitud total, en la que se incluye la estructura de horquilla contigua a la polimerasa. Las imágenes **a** y **f** constituyen ejemplos de complejos irresolubles que sin embargo presentan la polimerasa presumiblemente sobre el promotor A3, dada su distancia al extremo más cercano del fragmento.

A continuación se pasó a realizar medidas en aire buscando mejorar la resolución (**Figura IV.49d-f**). Se midieron los brazos de ADN emergentes en siete complejos donde la ARNp estaba situada en la zona de los promotores. Se observó una reducción importante de la longitud total del ADN, especialmente significativa en el fragmento más largo,

correspondiente a la región tardía. El modelo de la **Figura IV.50b-c** pretende explicar esta disminución de la longitud de contorno del ADN, atribuyéndola a la horquilla incluida dentro del volumen de la polimerasa y al efecto de la convolución de la punta. Estos resultados concuerdan con un modelo en el que la horquilla formada por p4 y p6 queda adyacente a la enzima, que, a su vez, se une sólo al promotor A3 (**Figuras IV.50 y IV.55.a**). Esto contrasta con el resultado obtenido para los complejos ADN-ARNp en ausencia de p4 y p6, en los que mayoritariamente la ARNp se unía a los promotores tempranos (**Figura IV.46c**).

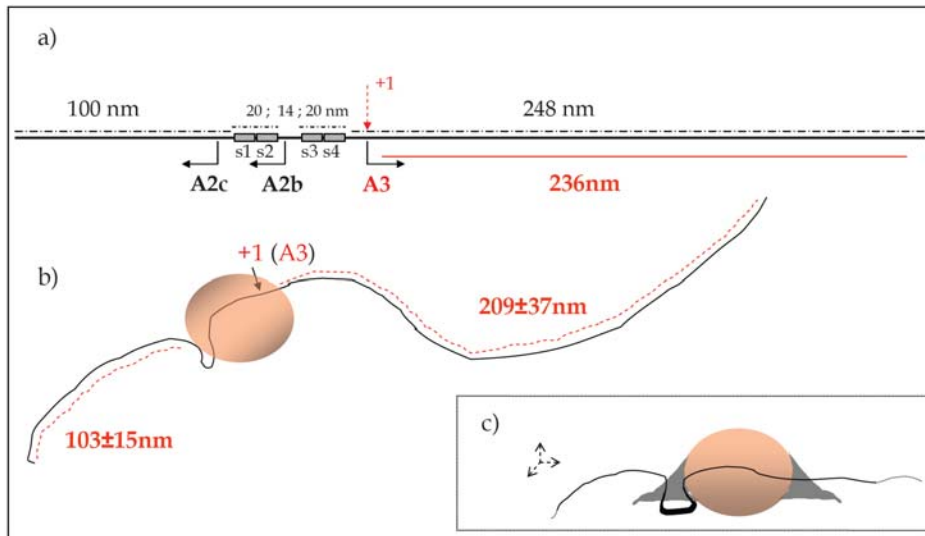


Figura IV.50. a) Esquema del fragmento de ADN en el que se especifica la distancia desde el sitio +1 de transcripción del promotor A3 hasta al extremo del fragmento: 236nm. b) muestra los valores promedio de las longitudes de los brazos de ADN emergentes del gran volumen que constituyen la polimerasa e hipotéticamente la horquilla, de siete de los complejos cuaternarios observados en aire. c) Representación de un posible perfil obtenido por el AFM debido a la convolución de la punta. La estructura de horquilla quedaría oculta, integrada dentro del volumen de la polimerasa. La reducción de la longitud del ADN emergente de dicho volumen quedaría así justificada.

i) [ADN_{Nf}-p4_{Nx}-p6_{Ny}]

Los resultados anteriores presentados en los apartados a-h sugieren que la estructura tipo horquilla descrita es la estructura funcional encargada de regular el paso entre la transcripción temprana y la tardía del fago Ø29. Buscando apoyar esta conclusión se estudió paralelamente un sistema similar: el del fago Nf, relacionado filogenéticamente con Ø29. Los

análisis bioquímicos habían mostrado que su transcripción presenta igualmente una etapa temprana y otra tardía, y que la transición entre ellas ocurre según un mecanismo regulado por, de nuevo, dos proteínas análogas a p4 y p6: **p4_N** y **p6_N**. En Nf, p4_N sólo se une en dos sitios, llamados por analogía “sitio1” y “sitio3” igualmente intercalados entre tres promotores similares a los A2c, A2b y A3 de Ø29 (**Figura IV.50a**). (Pérez-Lago *et al.*, 2005b).

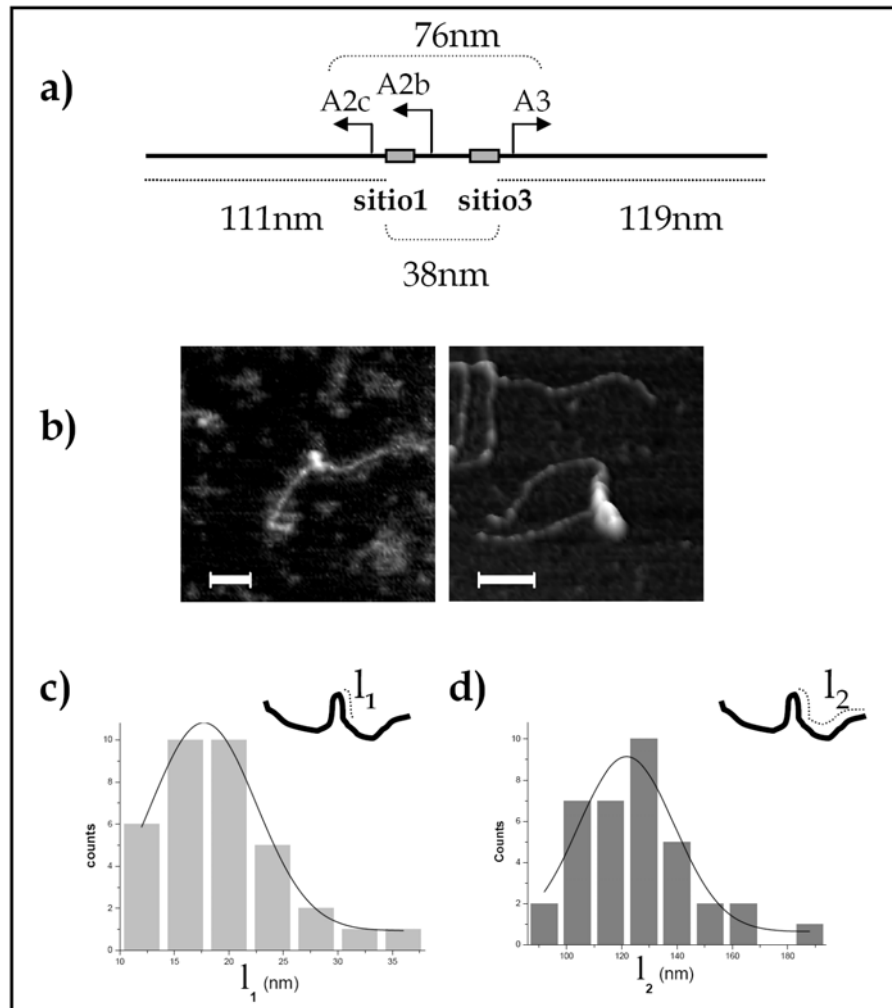


Figura IV.51. Topología del ADN en los complejos reguladores de la transcripción del bacteriófago Nf. a) Esquema del fragmento del genoma de Nf empleado en estos experimentos. Se indican los promotores tempranos: A2c y A2b y el tardío: A3, los dos sitios de unión (sitios 1 y 3) de la proteína p4_N, y las distancias entre el límite de los sitios 1 y 3 de unión de p4_N y los extremos del fragmento, así como la distancia entre ambos sitios. Todos estos valores han sido reescalados desde la longitud experimental

de contorno del ADN (~ 295 nm, calculados a partir del n° de pares de bases, $[0.338$ nm/pb]) a la longitud promedio experimental (269 ± 19 nm). **b)** Imágenes de AFM de dos complejos ternarios representativos, formados por las proteínas $p4_N$ y $p6_N$ de Nf. La estructura de horquilla presenta una longitud variable, en estos casos de 12 nm (izquierda) y 20.4 nm (derecha). Las imágenes se tomaron en aire. Las barras de escala corresponden a 50 nm. **c)** Distribución Gaussiana de longitudes de las horquillas " l_1 " centrada en 17.7 ± 9.7 nm ($N=36$). **d)** Histograma de las distancias medidas desde el vértice de la horquilla hasta el extremo más cercano del ADN, " l_2 ", ajustado a una Gaussiana centrada en 122 ± 35 nm ($N=36$).

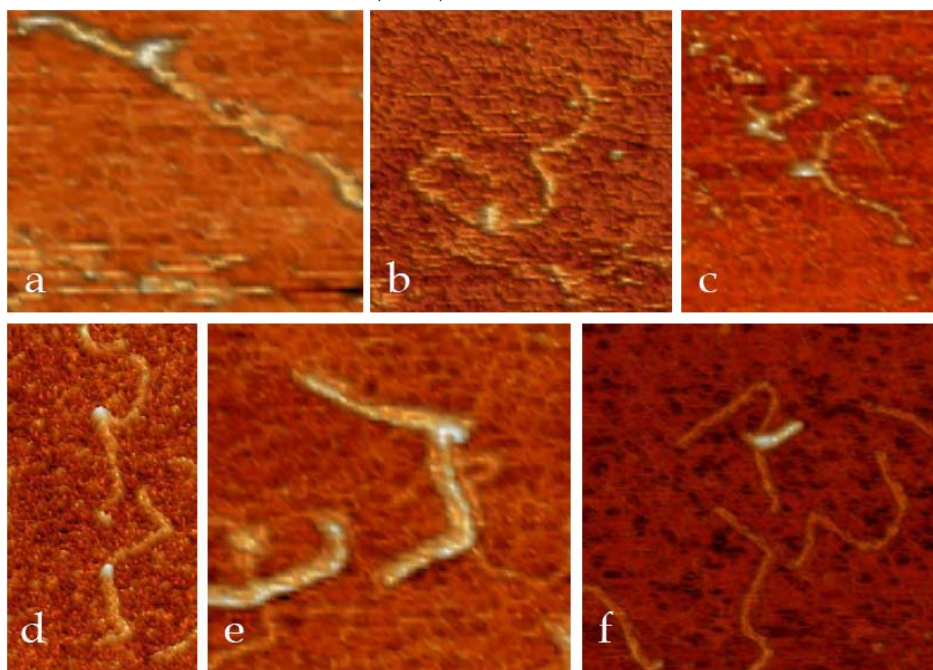


Figura IV.52. Galería de imágenes de AFM de los complejos $[ADN_{Nf}-p4_{Nx}-p6_{Ny}]$. Las imágenes **a**, **b** y **c** fueron tomadas en medio líquido. Las imágenes **d**, **e** y **f** se tomaron en aire.

Se estudiaron los complejos ternarios formados por la unión de las proteínas $p4_N$ y $p6_N$ a un fragmento del genoma de Nf de 871 pb que contenía la secuencia de los promotores (**Figura IV.51a**). La caracterización realizada mediante AFM mostró estructuras de tipo horquilla análogas a las de $\phi 29$ (**Figuras IV.51.b** y **IV.52**). El análisis de esta estructura se realizó en aire, después de haberla caracterizado en medio líquido y haber obtenido un referente con el que comparar los resultados. En aire la longitud de contorno del ADN libre se reducía un 8,6%, a un promedio de 269 ± 19 nm ($N=35$), un efecto descrito en la literatura (Liu *et al.*, 2005). La longitud de contorno en los complejos ternarios resultó 274 ± 44 nm ($N=25$).

La longitud promedio de la horquilla era de 16.6 ± 5 nm ($N=36$) (véase el histograma correspondiente de la **Figura IV.51c**) y se resolvió que la posición de su vértice dista un promedio de 128 ± 19 nm ($N=36$) del extremo más próximo del ADN (histograma de la **Figura IV.51d**).

IV.4.3. Discusión.

- Estructura inducida por la proteína nucleoidea p6 sobre el ADN

Se han analizado los resultados de los complejos ternarios [ADN- $p4_x$ - $p6_y$] y [ADN- $p4_{Nx}$ - $p6_{Ny}$] (del fago Nf) y cuaternarios [ADN- $p4_x$ - $p6_y$ -ARNp] con el fin de determinar la unión sinérgica de p6 a la región de los promotores, y los resultados estructurales obtenidos para los complejos binarios [ADN $_{C2}$ - $p6_y$] (en el extremo del genoma).

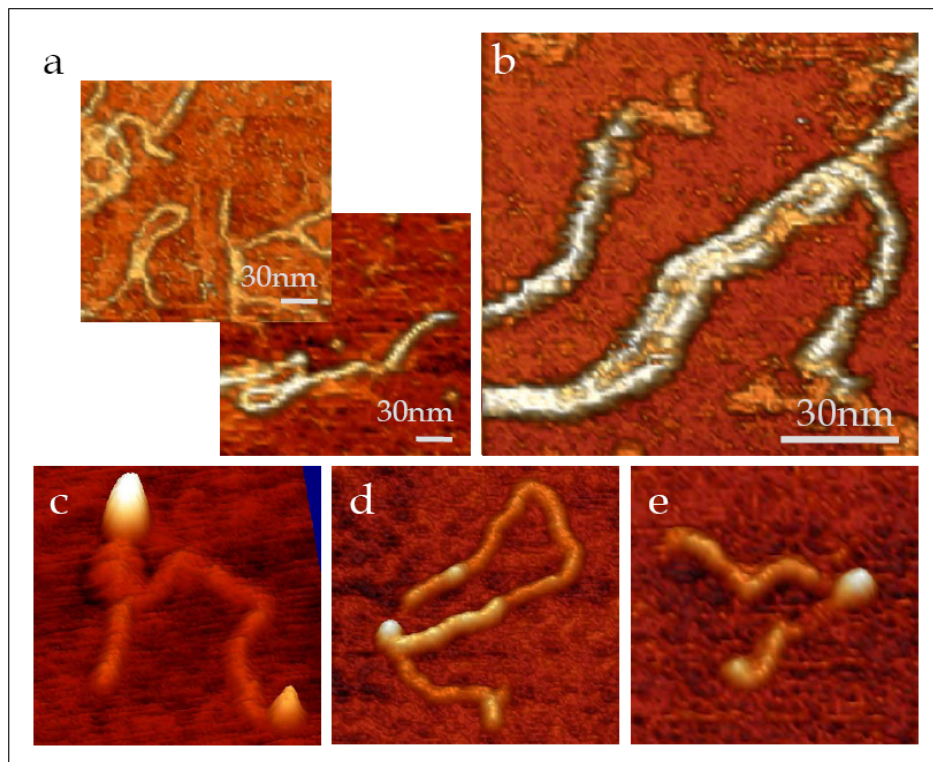


Figura IV.53. Ejemplos que evidencian la capacidad de polimerización de p6. a) dos ejemplos de complejos encontrados en la incubación de ADN, p4 y p6, en los que la proteína p6 cierra un bucle de ADN, presumiblemente curvado previamente por p4. b)

complejo encontrado en la incubación del complejo ternario en el que p6 actúa de puente entre cadenas distintas de ADN. **c)** atrapamiento de una ARNp en una muestra de complejos cuaternarios. **d)** Otra muestra ternaria, ejemplo de polimerización de p6 más allá de la horquilla, en dirección de los genes tardíos, sobrepasando el promotor A3, como descrito en la literatura (Camacho y Salas, 2004). **e)** Complejo ternario de Nf [ADN-p4_{Nx}-p6_{Ny}] en el que la proteína p6_N polimeriza desde los extremos del ADN hacia la horquilla, de manera independiente de éste.

La **Figura IV.53** muestra diversos casos de complejos visualizados en muestras ternarias (incubando conjuntamente ADN, p4 y p6) y cuaternarias (con ARNp) en los que p6 actúa presumiblemente de puente entre dos fragmentos distantes de una misma molécula de ADN (**a**), entre dos moléculas distintas de ADN (**b**), atrapando a la ARN-polimerasa en el lazo formado por las dos regiones distantes del ADN puestas en contacto (**c**), o en los que continúa polimerizando más allá de la horquilla, o incluso que polimeriza de forma independiente a ésta (**e**), desde los extremos del ADN, como se había descrito por ME que ocurre en los extremos del genoma.

Estos resultados sugieren que p6 actúa como una “cremallera” entre las hebras de ADN aproximadas por la horquilla, lo que se discute en el modelo de formación de la horquilla que se propone en el apartado siguiente.

Se había propuesto que p6 juega un papel en la organización y compactación del genoma de Ø29. Se trata de una proteína muy abundante, dado que se expresan unas 700000 copias por bacteria infectada (frente a las 100-500 copias de p4). Está involucrada en la replicación del ADN y se encarga de la represión del promotor temprano C2, situado en el extremo del genoma inicialmente eyectado en el interior de la bacteria (González-Huici *et al.*, 2006). El modelo de infección propone que, antes de que el genoma viral haya entrado entero en la bacteria, la ARNp bacteriana comienza a transcribir las proteínas p17 y p16.7 desde el promotor temprano C2 (véase **Figura IV.36**). La proteína p17 está implicada en la inyección del genoma y p16.7 en la organización de la replicación en la membrana. La expresión de ambas proteínas sólo se interrumpe cuando p6 reprime el promotor C2 (González-Huici *et al.*, 2004; Alcorlo *et al.*, 2007).

Se había descrito por ME la formación de polímeros nucleoproteicos compactos [p6-ADN_{C2}] que sugerían que la represión de C2 ocurre por oclusión de este promotor. Se ha demostrado además que p6 forma un complejo continuo sobre todo el genoma de Ø29, (Glez. Huici *et*

al., 2004; Alcorlo *et al.*, 2009). Se caracterizó una reducción de la longitud del ADN por efecto de la unión de p6 de entre 4,3 y 6,5 veces (Serrano *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1994). Esta disminución no se observó en los experimentos de AFM, debido a que las concentraciones incubadas de proteína, si bien muy superiores a las del resto de los complejos de esta tesis, eran 4000 veces inferiores a las empleadas en la bibliografía (condiciones de saturación), y que por tanto no daban lugar a complejos compactos.

En las muestras analizadas mediante AFM de los complejos formados por incubación de p6 con el fragmento de ADN que contiene el promotor temprano C2 (apartado d) se observaron pequeñas hileras de proteínas sobre el fragmento de ADN de 28-84 nm (cubriendo segmentos de 82-248 pb).

La ME había ya descrito la formación de complejos multiméricos de p6 sobre el ADN con longitud variable entre 130 y 2000 pb. Las muestras incubadas con el genoma de Ø29 y p6, prefijadas con psoraleno, eran sometidas a continuación a condiciones desnaturalizantes (Gutiérrez *et al.*, 1994). Los resultados de AFM aquí presentados confirman la formación de este tipo de estructuras en condiciones mucho más cercanas a las fisiológicas.

Estos resultados sugieren, por un lado que las hileras de p6 observadas constituyen el motivo mínimo de nucleación que da origen a los largos polímeros de p6 que organizan el genoma, compactándolo y protegiéndolo, una vez alcanzados los niveles suficientes de expresión de p6. Y por otro lado, que, además de esta función “arquitectónica” en la nucleación de los polímeros de p6, estas hileras pueden ejercer por sí mismas una función reguladora de la transcripción en las primeras etapas del ciclo del virus, como se ha visto en el complejo ternario, en la replicación (en la que actúa como activador al unirse a los extremos del ADN) y en la represión del promotor C2. En esta última, el mecanismo de represión descrito en la literatura no es de oclusión del promotor, sino de alteración de la estabilidad del complejo cerrado ARNp-ADN_{C2} por unión de p6 a secuencias adyacentes de C2 (Camacho *et al.*, 2001b).

Se ha descrito que la afinidad de p6 por el ADN es inversamente proporcional al grado de superenrollamiento negativo de éste (Alcorlo *et al.*, 2008) por lo que se podría esperar encontrar posiciones preferenciales de los puntos de nucleación de las hileras de p6. Para la proteína nucleoidea de *E. coli* H-NS, también de baja especificidad de secuencia, se

describió asimismo una dependencia de la unión en la conformación del ADN. En este caso las regiones preferentes de unión presentaban una curvatura intrínseca sobre las que H-NS polimerizaba formando complejos multiméricos nucleoproteicos (análogos a los de p6) (Azam *et al.*, 1999; Dame *et al.*, 2001). Se trata de un sistema semejante al de p6. Por ejemplo: esta proteína en solución se encuentra preferentemente formando tetrámeros (en equilibrio entre las formas monomérica, dimérica y tetramérica) al igual que p6, que oligomeriza formando dímeros, tetrámeros y hexámeros (Abril *et al.*, 1997). Se ha descrito además que HNS actúa como represor de algunos promotores impidiendo la formación del complejo abierto y no por oclusión (Schröder *et al.*, 2000).

Localizar las posiciones preferenciales de nucleación de las hileras en el fragmento, por marcaje de un extremo, sería el siguiente paso a seguir.

- **Modelo de formación de la estructura tipo horquilla**

El estudio estructural a nivel de molécula individual realizado mediante AFM ha demostrado la flexión que induce el factor de transcripción p4 sobre sus regiones de unión que había sido descrita por técnicas de *bulk*. Se ha visto que las curvaturas de las dos regiones colaboran en el 12% de los casos para cerrar el conjunto en una estructura de tipo horquilla. El aumento significativo de este tipo de configuraciones en las muestras de complejos ternarios [ADN p4_x p6_y], induce la idea de que la curvatura inducida por p4 establece las condiciones para la formación de una horquilla que es estabilizado y elongado por la presencia adicional de p6. Dada la capacidad de polimerizar de p6 (**Figura IV.53**), esta proteína puede estar actuando de cremallera entre las hebras de ADN.

La anchura de la distribución de longitudes de la horquilla de la **Figura IV.47b** revela que no es una estructura fija y sugiere que el mecanismo de su formación es dinámico, gobernado por fluctuaciones en las concentraciones de p4 y p6. La localización del vértice de esta estructura dentro de la región de los sitios de unión de p4 permite proponer que el crecimiento de la horquilla se origina desde esta región, debido a la interacción entre los dímeros de p4, y que es estabilizada por p6 y por la función “cremallera” de p6.

Los análisis de *footprinting* con radicales hidroxilo sobre el complejo ternario habían mostrado que los dímeros de p4 se unen a los sitios 1, 3 y 4, y que la proteína p6, desplazando a p4 del sitio 2, ocupa la secuencia entre los dímeros de p4 sobre los sitios 1 y 3. El aumento de concentración de p6 daba lugar a un cambio en la huella del sitio 4, lo que sugería que p6 polimeriza hacia el promotor A3. A concentraciones aún

mayores de p6 se observaba cómo la polimerización superaba el dímero de p4 unido al sitio 1. (Este último efecto se observa en la imagen IV.53.d). (Camacho y Salas, 2004).

Fundado en estos resultados bioquímicos y en los resultados estructurales obtenidos con el AFM se construyó el modelo estructural que se describe a continuación.

Las Figuras IV.54a1 y IV.54b1 representan los modelos estructurales para dos complejos, de distinta longitud: uno de ~18 nm (longitud promedio) y el otro superior, de ~28 nm. El modelo propuesto sitúa en contacto íntimo a los sitios 1 y 3 de unión de p4 (los de máxima afinidad), atribuyéndoles el origen de la formación de la estructura de tipo horquilla.

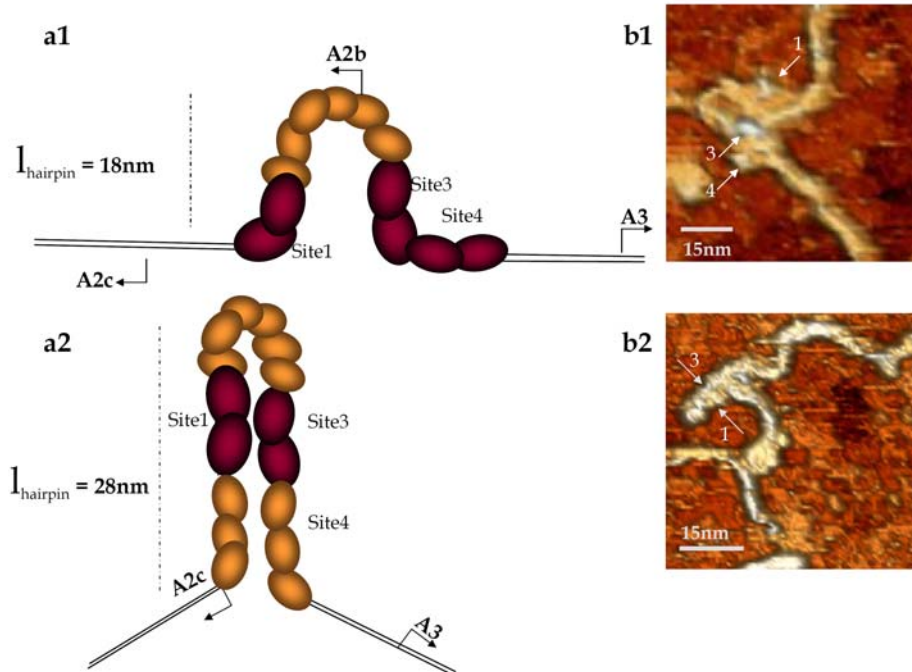


Figura IV.54. Modelo de la estructura tipo horquilla de longitud fluctuante. a) La unión de p4 (en granate) y de p6 (en naranja) a la secuencia entre los promotores A2c y A3 da lugar a la formación de una horquilla nucleoproteica con el vértice sobre el promotor A2b. a1) y a2) presentan los modelos correspondientes a horquillas de dos longitudes distintas, 18 y 28 nm respectivamente. En este último el sitio 4 de unión de p4 es reemplazado por p6 (Camacho y Salas, 2004). Las imágenes b1) y b2) muestran ejemplos de longitudes similares a las de los modelos a1 y a2. En ellas se indican las posiciones de p4 sugeridas por el modelo.

Con el fin de determinar si la estructura encontrada para el complejo nucleoproteico era sólo característica de Ø29 o, por el contrario, representaba un mecanismo más general, se analizó el sistema de regulación transcripcional del fago Nf. Se encontraron estructuras análogas de tipo horquilla (**Figura IV.52**) lo que sostiene la hipótesis de que ésta es la estructura funcional que está detrás del mecanismo interruptor del paso de la transcripción de los genes tempranos a la de los tardíos y demuestra que el mecanismo regulador no es sólo específico de Ø29 sino que se trata de un mecanismo general en otros fagos relacionados.

- Modelo de regulación

Dado que los complejos de transcripción cuaternarios estudiados por AFM se han formado en ausencia de NTPs y a Temperatura ambiente (la transición entre los complejos cerrado y abierto tiene lugar a temperaturas por encima de 10°C) y que se había descrito (Camacho y Salas, 2001a) que el complejo nucleoproteico [ADN p4_x p6_y] favorece la formación de los complejos transcripcionales en el promotor tardío, A3, e impide la estabilización del complejo cerrado en el promotor temprano A2b y del complejo abierto en el A2c, cabía esperar obtener complejos abiertos sobre el promotor A3.

Los resultados obtenidos del complejo cuaternario [ADN p4_x p6_y ARNp] muestran que, efectivamente, la polimerasa se une favorablemente en la región tardía del fragmento, *i.e.*, reconociendo el promotor tardío A3.

Este resultado invierte la estadística respecto de la localización de la ARNp en ausencia de p4-p6, preferentemente sobre los promotores tempranos (65:35% N=72). A pesar del alto porcentaje de complejos inespecíficos ARNp-ADN esperados para los experimentos de AFM (Dame *et al.*, 2002) la comparación de este resultado con la ocupación de la ARNp en los complejos cuaternarios constata la función del complejo nucleoproteico.

El máximo relativo encontrado para la localización de la ARNp en los complejos binarios sobre el promotor temprano A2a (débil) no es un resultado concluyente. Sin embargo sí lo menciono para que quede constancia del mismo si en el futuro se reanuda el estudio de este promotor. Dadas la baja afinidad de la ARNp por el promotor A2a, la baja presencia de ARN derivado de este promotor, y su localización con respecto a la región de los promotores donde se forma el complejo nucleoproteico, es posible que su función se reduzca a la de centro

adicional de atracción de la ARNp para aumentar la concentración local de ésta en la región de los promotores. Una vez adherida al ADN la polimerasa puede alcanzar los otros promotores por difusión desde este promotor. De forma que en ausencia de p4 y p6 la ARNp reclutada por el promotor A2a (a través de una unión lábil) migraría a los promotores A2c y A2b de transcripción temprana (pues el promotor tardío A3 es aún más débil), y en presencia del complejo nucleoproteico migraría a A3, contribuyendo a la transcripción tardía.

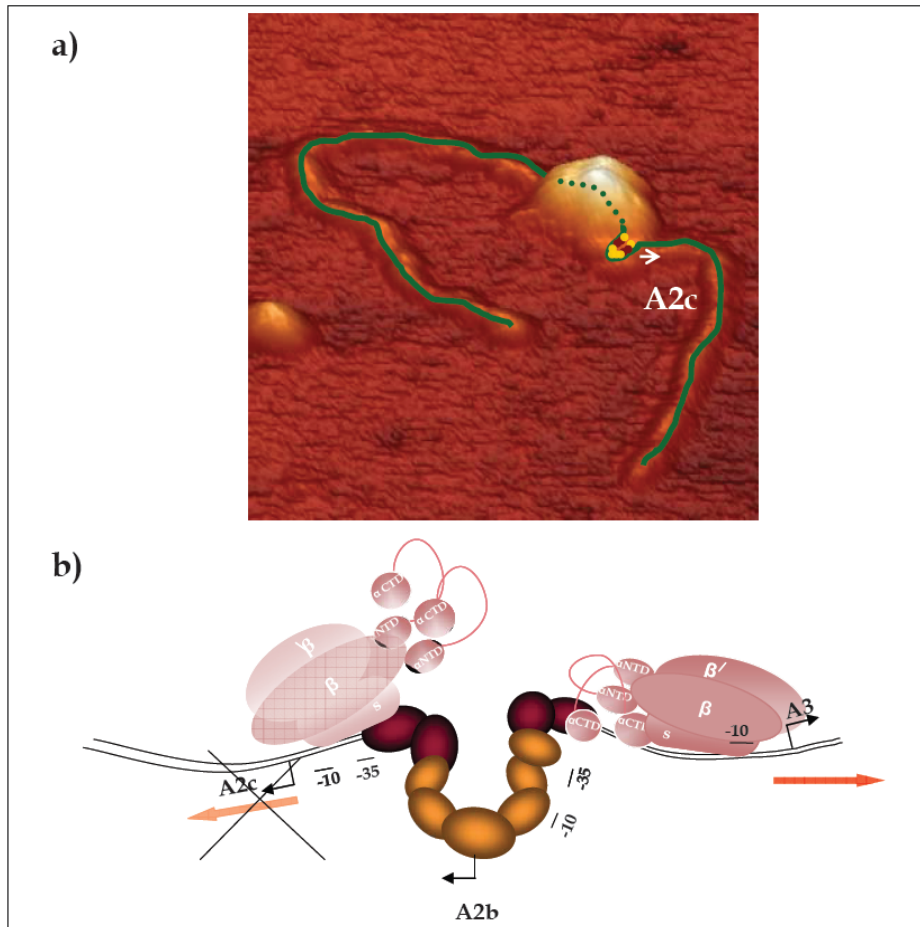


Figura IV.55 (a) Modelo del complejo cuaternario en el que se ha perfilado el contorno propuesto de la molécula de ADN, que se pliega en una horquilla en una posición adyacente a la ocupada por la polimerasa (presumiblemente sobre el promotor A3). (b) Modelo de regulación de los promotores A2c, A2b y A3 en presencia de las proteínas p4 y p6. La ARNp se representa establemente unida al promotor A3 mientras que la interacción con el promotor A2c es debilitada por la presencia de p4 ocupando el sitio 1, que coincide con la caja -35 del promotor.

El modelo propuesto sobre el mecanismo interruptor de la transición entre la transcripción temprana y la tardía basado en los resultados obtenidos es el siguiente:

- i) A cualquier longitud de la horquilla, el promotor A2b es ocluido y por tanto reprimido.
- ii) En una horquilla de la longitud promedio, ~18 nm, el promotor A2c queda reprimido por la unión de p4 al sitio 1, que solapa con su caja -35 (**Figuras IV.54a1 y IV.54a2**).
- iii) El promotor tardío A3 en todos los casos es acercado al temprano A2c, lo que posiblemente conlleva un aumento de la concentración local de ARNp que favorece el reconocimiento de A3. La ARNp puede saltar hasta él, desplazando el dímero de p4 del sitio 4 (como había sido descrito por Camacho y Salas, 2004) y siendo estabilizada a través de la de la subunidad α interacción con p4 del sitio 3. Este efecto activador de un factor de transcripción a través de la interacción de los dominios α -CTDs de la ARNp (estabilizando el complejo cerrado y estimulando la iniciación de la transcripción) es común a varios mecanismos (Rojo, 2001; McLeod *et al.*, 2002) y opuesto al descrito para el sistema de TodT (apartado IV.2) que reprime a partir del fuerte anclaje de los mismos dominios α -CTD, impidiendo el avance de la polimerasa.
- iv) En las horquillas más largas el promotor A2c quedaría también ocluido mientras que A3 permanece libre para ser reconocido por la ARNp (**Figura IV.54a2**).

IV.4.4 Perspectivas

Quedaría pendiente estudiar los complejos ternarios [ADN-p4_x-ARNp] para comprobar a nivel de moléculas individuales si ya la sola presencia de p4 favorece la unión de la ARNp en el promotor tardío A3, o si por el contrario es imprescindible la presencia adicional de p6.

El trabajo de este capítulo se realizó en colaboración con la Dra. Ana Camacho, del Centro de Biología Molecular CBM-UAM.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para los sistemas estudiados en esta tesis han sido presentados, analizados y discutidos en los cuatro capítulos precedentes (secciones IV.1.3, IV.2.3, IV.3.3 y IV.4.3). A continuación se discuten los resultados de manera global.

V.1. Caracterización estructural de complejos nucleoproteicos mediante AFM

La microscopía de fuerzas atómicas permite caracterizar con alta resolución la estructura de complejos adsorbidos a nivel de moléculas individuales en una superficie. Sin embargo, ciertas limitaciones experimentales condicionan la fiabilidad de la información obtenida. Éstas son:

- la alteración potencial de la estructura de los complejos debida a la adsorción sobre una superficie
- el daño que la punta puede causar en la muestra durante la toma de imágenes
- la dificultad de reunir un alto número de complejos sobre los que realizar un análisis estadístico.

Por tanto, es necesario verificar que el proceso de medida del AFM no perturba la estructura de los complejos de la muestra y que la estructura de estos complejos no ha sido previamente perturbada por la adsorción sobre la superficie, y garantizar un número suficiente de complejos en la superficie. A continuación se discuten estos tres aspectos.

- Adsorción de la muestra en superficie:

Los estudios de AFM requieren de una adsorción previa de la muestra sobre una superficie. Durante las casi ya dos últimas décadas se viene realizando un estudio exhaustivo tanto teórico como empírico de la interacción entre biomoléculas y superficies de distinta naturaleza, y especialmente sobre ADN y proteínas y la superficie de la mica (Müller *et al.*, 1997a; Czajkowsky *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 1999 y 2000). Algunos de estos trabajos han sido presentados en la Introducción. Experimentos como los de Thomson *et al.* (1996) o Kasas *et al.* (1997) en los que se controlaba la unión del ADN a la mica modificándola *in situ* (y observándola por AFM *in situ*) por inyección alternada de tampones con distinta fuerza iónica (y distinta naturaleza catiónica) demuestran la importancia de la naturaleza y

de la concentración de los cationes empleados en la incubación de la muestra sobre el sustrato para fijar los complejos nucleoproteicos. Los experimentos presentados en la introducción, realizados con las muestras de chaperoninas, cuya orientación sobre superficie se logró controlar mediante la preincubación de la mica con distintas concentraciones de ión K^+ , confirman en manos propias la influencia descrita de la naturaleza del tampón.

La literatura recoge estudios sobre la interacción con la mica de distintos cationes monovalentes (Na^+ , Li^+ , K^+ , Cs^+ , NH_4^+) divalentes (Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+}) y ternarios (espermidina³⁺), su papel como inhibidores o como puente de la unión de biomoléculas a la mica, e incluso sobre la unión distinta del ADN a igual fuerza iónica sobre la superficie de distintos tipos de mica (moscovita, biotita, brucita) y de otros silicatos laminares (clorita y vermiculita) (Valdrè *et al.*, 2004). En general se aceptan como óptimas las condiciones de muy baja fuerza iónica en las que la interacción ADN-superficie es tal que permite al ADN o al complejo nucleoproteico explorar distintas conformaciones hasta alcanzar la de equilibrio. De esta forma se garantiza caracterizar el complejo funcional, eso sí, con un grado de libertad menos al estar adsorbido a la superficie.

En estas condiciones (concentración de $Mg^{2+} < 4mM$) la concentración máxima admitida de iones monovalentes es muy baja ($\sim 10mM X^+$). A partir de ésta los cationes monovalentes compiten con los divalentes por los huecos negativos de la mica y los desplazan, y, en consecuencia, se inhibe la interacción ADN-mica. Los iones monovalentes son imprescindibles, sin embargo, y en concentraciones altas (fisiológicas), para que se establezcan las interacciones específicas ADN-proteína de los complejos estudiados, lo que vuelve estas condiciones poco adecuadas.

Además de la débil interacción muestra-superficie, el intercambio constante de cationes entre los huecos de la mica y la solución disminuye aún más la adsorción de la muestra, y la caracterización mediante AFM en medio líquido de las muestras incubadas a tan baja concentración de iones divalentes se vuelve muy difícil. Se han publicado ya varios artículos donde se revisan los modelos y condiciones aceptados por la comunidad y proponiendo nuevas aproximaciones al problema (Piétremment *et al.*, 2003; Pastré *et al.*, 2003 y 2006; Liu *et al.*, 2005; Sorel *et al.*, 2006).

En la elección y optimización de las condiciones empleadas en este trabajo se tuvieron en cuenta especialmente los resultados publicados sobre la mayor intensidad de la interacción ADN-mica mediada por los iones Ni^{2+} frente a la mediada por los iones Mg^{2+} de uso más extendido hasta entonces (Pastré *et al.*, 2003; Piétremment *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

- Caracterización con AFM:

La presencia de los distintos iones que facilitan la unión del ADN sobre la superficie de la mica afecta a la longitud observada del ADN. Se ha registrado una reducción de la longitud del ADN con respecto a la teórica (calculada según la relación 0,338 nm/pb), de en torno al 1,76% en las muestras observadas en líquido (con un error del 6%) y de un 7,7% en las observadas en aire (con un error del 8%). En ambos casos, el efecto de la reducción de la longitud de contorno es mitigado por la presencia de proteínas. Estos valores son coherentes con los encontrados en la literatura. En una publicación reciente donde se estudia mediante AFM el efecto de distintos cationes divalentes para adsorber el ADN sobre la mica, se describe para muestras incubadas en presencia de Mg^{2+} una reducción del 1,8% de la longitud del ADN si la muestra se encuentra sumergida en líquido (con un error de 5,2%) y del 3,5% en muestras medidas al aire (con un error de 4%) (Liu *et al.*, 2005). En las muestras incubadas en presencia de Ni^{2+} la longitud del ADN era ligeramente más corta. Estos dos cationes, Ni^{2+} y Mg^{2+} , son los empleados a lo largo de este trabajo de tesis. La reducción de la longitud experimental del ADN se debe a su anclaje a la mica a través de iones divalentes, que a su vez pueden interaccionar alternativa o simultáneamente con las bases y los fosfatos del esqueleto del ADN, neutralizando la carga negativa y compactando la estructura.

Por otro lado la reducción registrada en la dimensión Z de las medidas es igualmente justificable. La altura del ADN medida en las condiciones usadas principalmente en este trabajo (i.e. en tampón de fuerza iónica ~ 20-50 mM y mediante modo de contacto intermitente, *jumping*) osciló entre ~1,3 y 1,9 nm. Se ha descrito que la reducción con respecto a los 2 nm del diámetro teórico del modelo de Watson-Crick (Watson y Crick, 1953) se debe principalmente a la capa salina adsorbida a la superficie de la mica (procedente de los iones del tampón), y también a la deformación del propio ADN por la interacción con el sustrato y a la fuerza aplicada por la punta (Moreno-Herrero *et al.*, 2003a). Se ha resuelto que la contribución principal a la disminución de la altura del ADN en medidas de AFM en medio líquido se debe a la deformación elástica inducida por la punta, reduciéndose de 1,8 nm a 1,4 nm al aumentar la fuerza aplicada de 100 a 300 pN, en el orden de magnitud de las fuerzas aplicadas en este trabajo. Además se ha propuesto que el modo de operación empleado es quizás el más adecuado para la caracterización de estas muestras en medio líquido, dada la minimización de las fuerzas: normal y de adhesión (Moreno-Herrero *et al.*, 2003b).

- Formación de complejos nucleoproteicos y adsorción de éstos en superficie.

El otro aspecto crucial para este tipo de estudios es la presencia de un número suficiente de complejos en superficie sobre los que realizar un análisis estadístico. En esto influyen, por un lado la afinidad de interacción ADN-proteína, y por otro la adsorción de los complejos a la superficie.

El número de complejos en solución es reducido cuando la afinidad del regulador por el ADN es baja. Se puede aumentar la concentración de complejos incubando a altas concentraciones de ADN y proteína. Sin embargo en estas condiciones el exceso de proteína libre en solución se adsorbe en la superficie y dificulta la toma de imágenes de alta calidad. En la mayoría de los casos la labilidad de los complejos impide someterlos a pasos posteriores de purificación mediante cromatografía o diálisis. Los complejos fijados con bajas concentraciones de glutaraldehído y/o formaldehído tampoco resultan suficientemente estables para resistir una purificación adicional y el empleo de concentraciones mayores de agente de fijación puede introducir artefactos en las estructuras caracterizadas.

El bajo número de complejos en superficie se debe además a las condiciones de adsorción de los mismos sobre la mica. Estudios acerca de la influencia de la superficie de la mica sobre la interacción ADN-proteína han demostrado que a baja fuerza iónica el número de complejos ADN-proteína es mucho menor en superficie que en solución, mientras que a alta fuerza iónica es similar (en superficie y en solución). En condiciones de baja fuerza iónica los iones de la solución se concentran en torno a la superficie de la mica dando lugar a una región con altísima carga local que los complejos tendrán que atravesar para adsorberse. Al aproximarse a esta región los complejos tienden a disociarse, dado que la constante de disociación aumenta a alta fuerza iónica (Sorel *et al.* 2006). En condiciones de alta fuerza iónica este gradiente es casi imperceptible y el efecto de disociación no se aprecia.

Como se ha discutido ya, hasta ahora lo aceptado por la comunidad científica era adsorber las muestras a la mica en condiciones de baja fuerza iónica (lo que, en principio, garantizaría la menor K_D , *i.e.* la mayor afinidad del complejo) arguyendo que tales condiciones no afectan a la estructura del complejo al permitirle difundir sobre la superficie y explorar y encontrar su configuración de equilibrio. Sin embargo estas condiciones exigen una concentración proteica mayor que la necesaria en solución (puesto que a baja fuerza iónica se reduce la afinidad del complejo en superficie), lo que resulta en la unión inespecífica de la proteína libre

excedente sobre la superficie. Esto dificulta las medidas del AFM, como se ha visto a lo largo de este trabajo. Publicaciones recientes alertan además sobre el proceso de equilibrio de disociación de los complejos adsorbidos a una superficie (**Figura V.1**) (Sorel *et al.* 2006). Por tanto, el porcentaje de complejos observables (adheridos y conservados sobre la mica) es inferior al encontrado en solución, y aún menor que el inicialmente adsorbido, por disociación en la superficie.

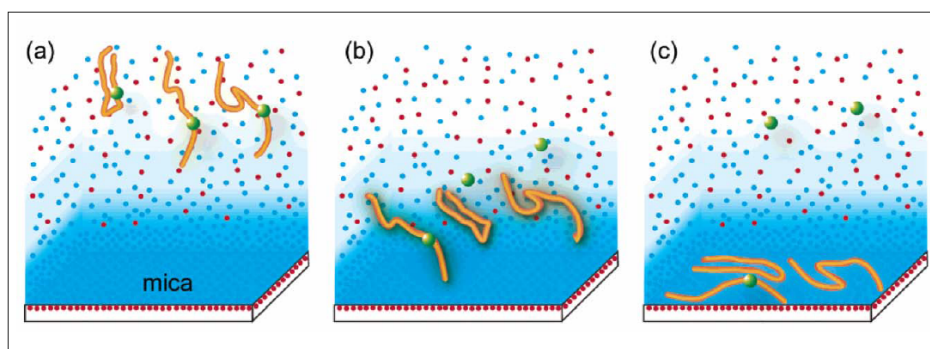


Figura V.1. Esquema del modelo de adsorción en dos pasos propuesto para los complejos EcoRI-ADN (Sorel *et al.*, 2006). En rojo: las cargas negativas, en azul: las cargas positivas y en verde: la proteína, EcoRI de *E. coli* en este estudio. **(a)** Los complejos EcoRI-ADN se forman en solución. Al aproximarse a la superficie de la mica (muy cargada con iones positivos) la fuerza iónica aumenta. **(b)** El efecto de este aumento de la fuerza iónica se manifiesta en la disociación de varios complejos antes de ser totalmente adsorbidos. Las proteínas permanecen en solución. (Este último punto no coincide con lo observado en las muestras del presente trabajo de tesis puesto que la proteína libre recubría una alta proporción de la superficie de la mica en todas las muestras. Si bien la superficie de las proteínas que forman complejos nucleoproteicos contiene una región cargada positivamente de unión al ADN, el resto de la proteína es menos homogénea y sí pueden establecerse interacciones con las que adsorberse a la mica). **(c)** Los complejos EcoRI-ADN restantes, una vez adsorbidos a la superficie y habiendo adoptado una conformación bidimensional, sufren un proceso lento de disociación. (Modelo e imagen tomados de Sorel *et al.* 2006).




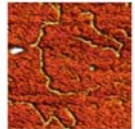
Entre los complejos estudiados en este trabajo los complejos binarios: [TodT-ADN] ($K_D = 1,6-7 \mu M$), [p4-ADN] ($K_D \sim 1 \mu M$) y [p6-ADN] ($K_D = 2,5 \mu M$) presentaban una constante de afinidad ADN-proteína relativamente baja, con lo que cabía esperar una baja concentración de estos complejos en solución. Por otro lado, los complejos de [BzdR-ADN] a pesar de la mayor afinidad de BzdR por sus sitios de unión ($K_D \sim 50 nM$) mostraban gran heterogeneidad estequiométrica y poca representación de la superestructura con todos los sitios de unión ocupados. Además, la

incubación de la muestra sobre la mica se realizó en condiciones de baja fuerza iónica, en las que el número de complejos en superficie se reduce con respecto al número en solución, como ya discutido. Por todo esto, para caracterizar estructuralmente todos los complejos estudiados fue necesario realizar un gran número de experimentos.



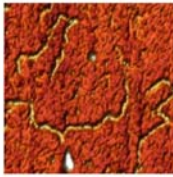
A pesar de las dificultades descritas, tras optimizar las condiciones de incubación de los complejos y las condiciones de preparación de las muestras de AFM y de medida con esta técnica para cada uno de los sistemas de estudio de esta tesis, se ha logrado caracterizar con alta resolución un número suficiente de complejos con el que proponer un modelo estructural (**Figura V.2**) y de regulación (**Figura V.3**) para cada uno de estos sistemas.

V.2. Estudio comparativo de los distintos sistemas de regulación de la transcripción estudiados

El **Cuadro V.1** describe los cuatro sistemas de regulación transcripcional estudiados en esta tesis e ilustra los resultados obtenidos sobre la estructura de los principales complejos.

Proteína estudiada	Función reguladora	Organismo	Datos bioquímicos	Resultados de AFM
TtgV (efectores oligomerizantes)	Represor Efector: tolueno	<i>Pseudomonas putida</i> estirpe DOT-T1E	Tetrámeros / 1caja	
TodT (fosfato TodS)	Represor (activador: IHF) (efector: fosfato)	<i>Pseudomonas putida</i> F1	monómeros / 5 cajas	
BzdR (BzCoA)	Represor (activador: AcpR) Efector: BzCoA	<i>Azoarcus sp. CIB</i>	Dímeros / 4 ó 5 cajas	
p4 - p6	Represor/activador	<i>Bacteriófago Ø29</i>	p4: dímeros/4 cajas p6: dímeros/ n	
		<i>Bacteriófago Nf</i>	p4 _N : dímeros /2cajas p6 _N : dímeros / n	

Cuadro V.1.

Complejos principales estudiados	Resultados estructurales	Descripción de la estructura resuelta por AFM	Modelo de regulación propuesto
[TtgV-ADN(P_{TtgGH})]		Estructura angular, con una flexión convexa de $57 \pm 13^\circ$.	TtgV actúa como represor según un doble mecanismo que conjuga el impedimento estérico y la distorsión de la estructura del ADN y que dificulta el reconocimiento del promotor y, por tanto, su transcripción.
[TodT-ADN(P_{TodX})] y [TodT-IHF-ADN]		Estructura de tipo horquilla. El número de complejos con esta configuración aumenta en presencia del activador IHF	TodT pliega la región del promotor en un <i>hairpin</i> , e interacciona con las α -CTDs de la ARNp, mientras IHF estabiliza la interacción de la ARNp con su promotor a través de su subunidad σ . La fosforilación de TodT afecta exclusivamente a su interacción con las α -CTDs, liberando la ARNp, sin deshacer la estructura.
[BzdR-ADN(P_N)] y el mismo en presencia del efector Bz-CoA		Superestructura de tipo lazo, configurada a partir de la interacción entre la BzdR unida a sus cinco sitios.	BzdR genera una superestructura que impide el reconocimiento del activador y del propio promotor por parte de la ARN-polimerasa. La unión posterior del efector genera un cambio conformacional que desarticula la superestructura, revelando las coordenadas del promotor y del activador a la ARNp y activándose así la transcripción.
[p4-p6 _y -ADN] y [p4 _{NK} -p6 _{Ny} -ADN]		Estructura de tipo horquilla en ambos complejos ternarios (de $\phi 29$ y de N_f).	La estructura generada por la unión de p4 y p6 a la región de los promotores A2c, A2b y A3, desactiva los dos primeros por oclusión y activa al último por estabilización de la ARNp en él a través de la interacción con las α -CTDs y la subunidad σ de la ARNp.

Cuadro V.2

El Cuadro V.2 describe los resultados estructurales obtenidos para cada uno de estos complejos nucleoproteicos y los modelos de regulación propuestos a partir de ellos para los cuatro sistemas estudiados. Asimismo, los modelos estructurales propuestos para los complejos funcionales de



De la comparación de estos cuatro sistemas se infieren tres variables directamente involucradas en la regulación:

- la afinidad de la unión a una o varias secuencias del ADN situadas en las proximidades de las cajas -10 y -35 de reconocimiento de la ARNp del promotor regulado, o directamente solapando con ellas.
- la configuración tridimensional del complejo nucleoproteico.
- la modulación de alguna de las variables anteriores, o de ambas, como respuesta a la unión de un efector.

A continuación describo a la luz de estas tres variables los modelos estructurales y funcionales propuestos a partir de los resultados obtenidos para cada sistema.

El sitio de unión del **represor TtgV** solapa con la caja -10 del promotor P_{ttgGHI} y con la caja -35 del promotor P_{ttgVW} de manera que TtgV dificulta el acceso a la ARNp por simple impedimento estérico (**Figura V.2a**). Además induce un ángulo en su sitio de unión y como consecuencia de esto cambian la configuración del ADN y la distancia relativa entre las cajas -10 y -35 del promotor. De esta forma se reprime la expresión del operón TtgGHI. La reactivación de la expresión tiene lugar tras la aparición de un efector externo (un disolvente orgánico) que despega el represor de su sitio de unión (*i.e.* mediante un sistema de des-represión) (**Figura V.3a**).

La **Figura V.2** pone en relieve la relación entre la complejidad estructural del complejo regulador y la baja afinidad de la proteína reguladora por su sitio de unión en el ADN. En el ejemplo de TtgV, de alta afinidad ($K_D = 2\text{-}15\text{ nM}$) no se requiere más que un sitio de unión, mientras que en los sistemas de baja afinidad (TodT, BzdR y p4/p6, con K_D en el rango: $50\text{nM-}7\mu\text{M}$) se requiere la actuación coordinada de varias proteínas unidas a múltiples sitios de unión.

Las características principales comunes a los otros tres sistemas son, por tanto: la baja afinidad de la unión entre la proteína reguladora y el ADN, y las estrategias desarrolladas para compensarla, basadas en la unión cooperativa a varios sitios próximos entre sí y en la reestructuración del ADN generando complejas configuraciones tridimensionales.

El **represor BzdR** genera una superestructura impenetrable por unión cooperativa a sus tres sitios y posterior plegamiento del complejo en una estructura tipo lazo, por interacción interproteica (**Figura V.2c**). La superestructura se forma en la región del promotor al que regula y se

desarticula como respuesta a la presencia del efector Bz-CoA. Éste induce un cambio conformacional en BzdR que presumiblemente debilita la interacción proteína-proteína que sostenía la superestructura. De esta forma el activador AcpR puede unirse a su sitio de unión y se descubren las secuencias de las cajas -10 y -35 a la ARNp (**Figura V.3c**).

El **represor TodT** se une cooperativamente a cinco sitios contiguos y pliega el ADN en una estructura de tipo horquilla que en este caso recluta la ARN-polimerasa y la retiene sobre el promotor (a través de la interacción con su subunidad α -CTD) en lugar de ocultarle sus secuencias de unión al ADN (como en el sistema anterior de BzdR). La aparición posterior del efector (fosfato) induce un cambio conformacional en TodT que no desarticula la superestructura pero sí afecta a la interacción TodT-ARNp, liberándose esta última (según el modelo aquí propuesto) y activándose la transcripción del promotor.

La importancia de la cooperatividad de la unión se manifiesta claramente en este sistema. La aparición de tolueno en el medio estimula la expresión del operón *tod* a través de la fosforilación de TodS, el sensor de tolueno, y de la transfosforilación desde éste a TodT. Resultados recientes de experimentos *in vivo* (Busch *et al.*, 2009) muestran que en ausencia de tolueno la concentración de TodT es extremadamente baja. Este resultado da una idea de la importancia de la cooperatividad en la unión de TodT al ADN para contrarrestar su baja afinidad, dado que el complejo nucleoproteico se encuentra en la bacteria de forma constitutiva.

En ambos sistemas de regulación los represores BzdR y TodT actúan de manera coordinada con los activadores AcpR e IHF. Los sitios de unión de AcpR e IHF están localizados sobre la secuencia -35 de reconocimiento de la ARNp, que en ambos promotores difiere mucho de la secuencia consenso. De esta forma, la función activadora está basada en la estabilización del complejo ARNp-promotor a través de una interacción adicional con la subunidad σ de la ARNp y, en el caso de AcpR, también con las α -CTDs (**Figura IV.20b**).

Por último, el **sistema de regulación del bacteriófago Ø29** también presenta una unión cooperativa del factor de transcripción p4 a sus cuatro sitios de unión, intercalados entre los promotores A2c, A2b y A3 (y próximos o solapando con las cajas -10 y -35 de estos promotores), con una afinidad bastante baja por sus sitios aislados ($k_D = 200\text{nM}$ - 1600nM). Esta proteína flexiona el ADN en cada uno de sus sitios y el conjunto tiende a cerrarse en una estructura de tipo horquilla. La unión sinérgica de la proteína nucleoidea p6 a esta región de ADN previamente reestructurada por p4, estabiliza esta configuración. La estructura final actúa simultáneamente como activador y represor de los promotores localizados

en esa región, según diversos mecanismos ya discutidos para los sistemas anteriores: los promotores tempranos A2c y A2b se reprimen, el primero por desestabilización de la interacción de la ARNp por impedimento estérico (el sitio 1 de unión de p4 ocupa la caja -35 de la ARNp) y el segundo por oclusión del promotor cuyas cajas quedan dentro de la estructura inexpugnable de la horquilla. A su vez el promotor tardío A3, cuya caja -35 está muy alejada de la secuencia consenso, queda activado por estabilización de la ARNp en su promotor a través de la interacción de las α -CTDs con la estructura de la horquilla, concretamente con el dímero de p4 en el sitio 3, y por lo tanto, mediante un mecanismo similar al descrito para la función de los activadores IHF y AcpR. El cambio en el sentido de la transcripción del genoma viral está determinado por la generación de la estructura de tipo horquilla descrita, que a su vez es resultado de un cambio puntual en las concentraciones locales de p4 y p6 registrado durante el ciclo funcional del bacteriófago.

Los niveles de los factores de transcripción varían a lo largo del ciclo funcional de la bacteria o del virus, por lo que la regulación de los promotores es sensible a las condiciones fisiológicas. Además, la actuación coordinada de proteínas reguladoras diferentes unidas al ADN cooperativamente (como BzdR y AcpR, o TodT e IHF) o sinérgicamente (como p4 y p6) permite conectar entre sí señales reguladoras distintas. La modulación adicional por parte de un efector externo, como es el caso de los tres primeros sistemas presentados (los de TtgV, TodT y BzdR) permite además conectar la expresión de dicho promotor con las variaciones ambientales.

V.3. Reestructuración del ADN inducida por factores de transcripción.

Los mecanismos de regulación de la actividad génica estudiados incluyen la participación de complejos nucleoproteicos que reestructuran la topología del promotor, sea flexionándolo, sea formando una estructura compleja cerrada, en forma de lazo o de horquilla.

La inducción de configuraciones angulares en el ADN por la unión de uno o varios factores transcripcionales, como en el sistema de TtgV, es un mecanismo muy común en la regulación de la expresión génica. Mediante AFM se han descrito numerosos sistemas de este tipo (Rees *et al.*, 1993; Erie *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2004; van Noort *et al.*, 2004; Seong *et al.*, 2002; Dame *et al.*, 2005b).

La formación de estructuras de tipo lazo o *loops* permite que la regulación la ejerzan factores de transcripción unidos a sitios distantes del promotor.

Entre los sistemas de regulación a través de la formación de lazos descritos en la literatura, se encuentran los de los operones: *araCBAD* (regulado por el represor AraC) (Schleif *et al.*, 1992, Dunn *et al.*, 1984), *gal* (regulado por el represor GalR) (Virnik *et al.*, 2003; Lia *et al.*, 2008), *lac* (regulado por el represor LacR) (Swigon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Zurla *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008) de *E. coli*, y el encargado del mecanismo interruptor del paso de la etapa lisogénica a la lítica en el fago λ (regulado por el represor λ) (Révet *et al.*, 1999). Las dimensiones de estos lazos son del orden de 38nm (113 pb) en GalR, 71 nm (210 pb) en AraC y 27nm (81 pb) o 139nm (412 pb) en LacR (variable en este último caso en función de los sitios ocupados por el regulador). Estas configuraciones son comparables en longitud al lazo descrito para el sistema de BzdR (de ~100 nm de perímetro), pero difieren en que su estructura queda cerrada por la interacción de una o dos proteínas con dos regiones distantes del ADN, y unen los extremos del lazo, mientras que la estructura de BzdR une al menos cuatro dímeros que interaccionan entre sí generando una estructura compacta rodeada por el ADN.

Todas las estructuras tipo lazo descritas son más amplias que las encontradas para los complejos binarios [p4-ADN] de $\phi 29$ (de ~13 nm de longitud promedio, " $\langle l \rangle$ ", y por tanto de longitud del contorno del ADN, " l_c ", de ~26 nm) y los ternarios [p4-p6-ADN] de $\phi 29$ y Nf ($\langle l \rangle$ ~18 nm, l_c ~36 nm), y los complejos binarios [TodT-ADN] y los ternarios [TodT-IHF-ADN] de *Pseudomonas putida* ($\langle l \rangle$ ~13 nm, l_c ~26nm). La estructura tipo horquilla no es tan frecuente como aquella de lazo. Hasta ahora habían sido descritas tan sólo dos estructuras de este tipo para complejos nucleoproteicos de ADN de doble banda con esta configuración mediante microscopía electrónica o de fuerzas: el formado por H-NS (de *E. coli*) y una secuencia modelo (Dame *et al.*, 2001), y el formado por el activador RocR (de *Bacillus subtilis*) sobre su secuencia de unión en la región intergénica *rocG-rocA* (Ali *et al.*, 2003).

Los estudios termodinámicos realizados sobre las estructuras de tipo lazo las clasifican en dos categorías: las estructuras que pliegan una longitud del ADN menor que su longitud de persistencia (~150 pb, 51 nm) en las que la variable determinante es la elasticidad del ADN, y las estructuras más largas que la longitud de persistencia, en las que prima la probabilidad de encuentro entre dos regiones distantes del ADN durante su movimiento errático dentro de la célula (Saiz y Vilar, 2006). Las tres estructuras de tipo horquilla resueltas en esta tesis (para los fagos Nf y $\phi 29$ y en torno al promotor P_{todX} de *P.Putida*), clasificables en la primera

categoría, se forman con un ADN efectivamente muy flexible. Las tres secuencias son muy ricas en ATs (adenina-timina) y contienen varios *tracks* de As (hileras de Adeninas consecutivas) en tándem, lo que confiere una gran flexibilidad de corto y largo alcance (Figuras IV.9 y V.3). Cada uno de los sitios de unión de los dímeros de p4 y p4_N de Ø29 y Nf, presenta tres *tracks* de As separados que permiten a p4 curvar fácilmente el ADN (Figura V.3), concretamente por estrechamiento del surco menor y flexión del eje del hélice (Mendieta *et al.*, 2007). La secuencia en torno al promotor P_N presenta igualmente una secuencia de estas características (Figura IV.19). Las propias secuencias de las cajas de reconocimiento de la ARNpolimerasa, que con frecuencia solapan o se intercalan con las de los sitios de unión de los reguladores, son siempre regiones muy flexibles.



Figura V.3. Secuencias de los cuatro sitios de unión de p4 ordenadas de mayor a menor afinidad. En la secuencia del sitio 3 se indican los *tracks* de As con un recuadro. (Figura tomada de Mendieta *et al.*, 2007).

Por otro lado la rigidez torsional del ADN exige que las proteínas que interaccionan para cerrar el lazo se encuentren en la misma cara o plano del ADN (Dunn *et al.*, 1984). Efectivamente, observando la distancia entre los puntos medios de los sitios de unión en estos sistemas parece repetirse un período de entre 10,5-10,9 pb.

Modelos computacionales basados en simulaciones dinámicas del ADN han demostrado la dependencia existente entre la formación de estructuras tipo lazo y la curvatura intrínseca o la flexibilidad de la secuencia del ADN (Swigon *et al.*, 2006; Goyal *et al.*, 2007). Otras aproximaciones, como la del modelo termodinámico-estadístico de Zhang *et al.* (2006), contemplan además la flexibilidad proteica como variable. Se han llegado a calcular las energías libres de formación *in vivo* del lazo en una aproximación muy prometedora que combina la modelización

computacional y los resultados experimentales (Saiz *et al.*, 2006). Relacionando los niveles de expresión *in vivo* (datos experimentales) con la probabilidad de ocupación de un sitio del represor, y ésta a su vez, con los parámetros del equilibrio de unión del represor al ADN, y contemplando el número de sitios de unión, se logra conectar de forma cuantitativa una función termodinámica (ΔG_{lazo}) con los datos experimentales, generando predicciones sobre las propiedades asociadas a estas estructuras. Entre éstas, la deducción de parámetros cinéticos como la constante cinética de la formación del lazo (Vilar *et al.*, 2003), y el efecto ejercido por estas estructuras sobre las fluctuaciones intrínsecas de la transcripción (reduciendo el ruido transcripcional) (Vilar *et al.*, 2005).

Aunque estos aspectos exceden la discusión de la presente memoria, se mencionan para señalar que el análisis de los resultados estadísticos de los experimentos de moléculas individuales podría apoyar y refinar los modelos teóricos. De ahí el interés de dejar reflejado el estado del arte de este tipo de estudios.

V.4. Modelos de los mecanismos generales de regulación de la transcripción: Modulación de la afinidad de la ARN-polimerasa por los promotores.

La **figura V.4** representa los distintos mecanismos propuestos en esta tesis, por los que se favorece y reprime la unión de la ARNp a los promotores regulados. La conformación adoptada por cada complejo regulador parece adecuarse al tipo de respuesta requerida.

La ARN-polimerasa presenta una afinidad por el ADN muy superior a la de los factores de transcripción aquí estudiados, entre 10^3 y 10^6 veces superior, de acuerdo al valor determinado experimentalmente para la interacción entre la ARNp de *E. coli* y el promotor T7: $k_A \sim 10^{11} \text{M}^{-1}$ (Hinkle y Chamberlin, 1972). Una vez permitida su unión al promotor y la formación del complejo abierto, competirá y desplazará a todos los factores de transcripción por separado que obstaculicen su camino en la transcripción y también deshará las superestructuras formadas por éstos. De ahí la importancia de las estrategias desarrolladas por los sistemas estudiados para impedir que se forme el complejo cerrado, ocultando las cajas del promotor, o que se forme el complejo abierto, reteniendo la ARNp o confinándola.

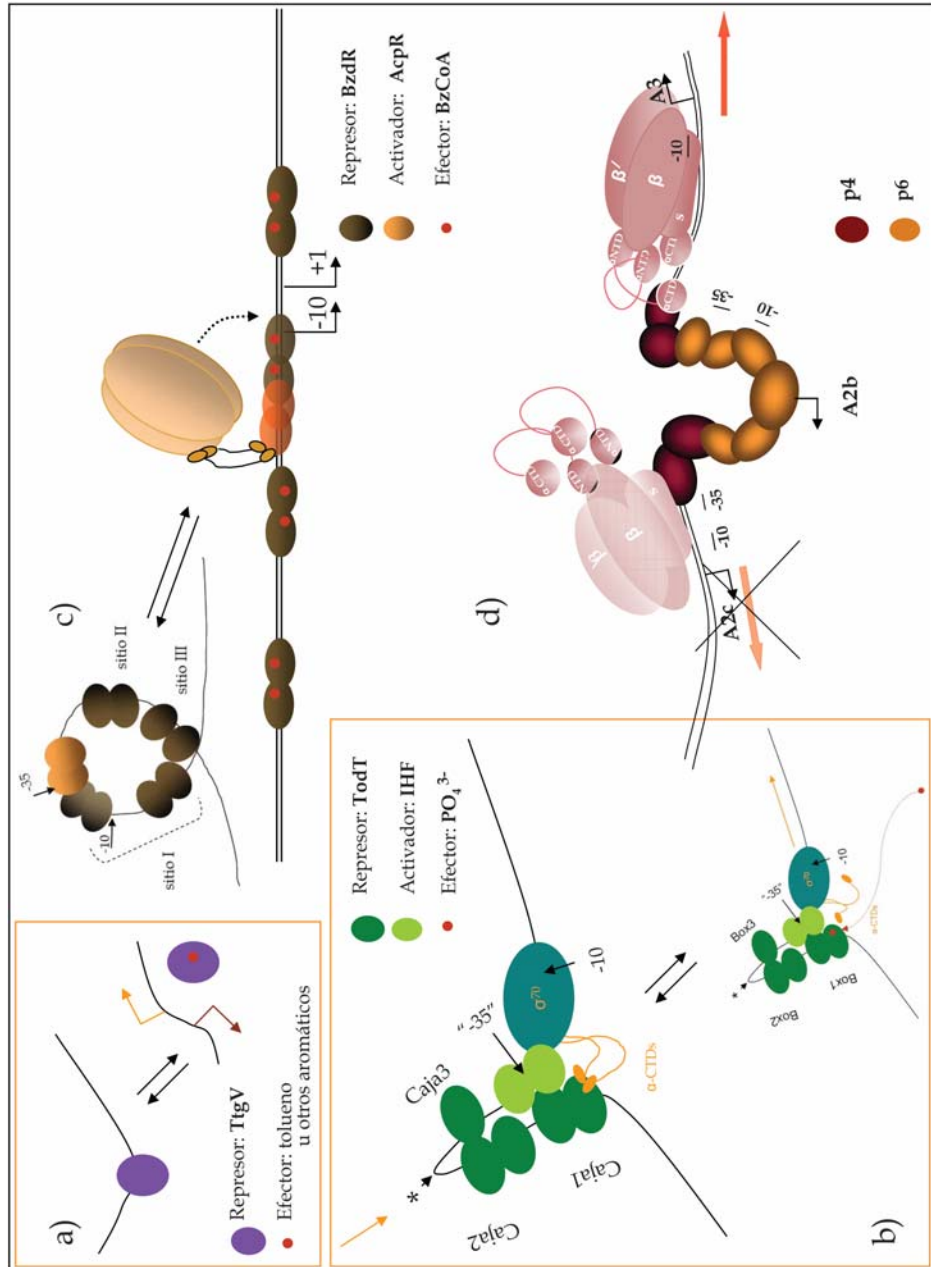


Figura V.4. Modelos propuestos para los mecanismos de regulación en los cuatro sistemas estudiados. Nótese que los sistemas de TtgV (a) y Ø29 (d) contienen dos o tres promotores en la misma región, cuya expresión es simultánea en un caso (a) y alternada en otro (d).

La proteína TtgV reprime el promotor P_{TtgGHI} de forma muy efectiva, uniéndose fuertemente a un único sitio que solapa con la caja -10 del promotor, ocluyéndolo y modificándolo topológicamente. El sistema debe responder rápidamente cuando se sobrepasa el umbral de concentración a partir del cual el efector, anteriormente fuente de carbono y de energía, pasa a ser letal. La unión de dicho efector desprende inmediatamente TtgV del promotor y se activan la expresión de las bombas de expulsión del efector fuera de la bacteria y la expresión del propio represor TtgV. Esto garantiza que una vez recuperados los niveles normales del efector, deja de des-reprimir el promotor y recupere su papel de nutriente.

El sistema de BzdR requiere de la participación de al menos cinco dímeros de este represor unidos a sitios contiguos del ADN. Impide la transcripción del promotor P_N , encerrándolo, presumiblemente junto con el activador AcpR, dentro de una superestructura infranqueable. BzdR es constitutiva de forma que siempre se encuentra localizada sobre la región del promotor. Sin embargo, en presencia de una fuente de carbonos aromáticos que se manifiesta en la aparición de Bz-CoA, se hacen necesarias las enzimas metabólicas codificadas en el operón *bzd* y se debe activar la transcripción del mismo. La respuesta es igualmente eficaz: la Bz-CoA induce un cambio conformacional de BzdR al unirse a éste y se desarticula la férrea superestructura, descubriéndose la presencia de las cajas del promotor y del activador para que la ARNp los reconozca e inicie la transcripción.

El sistema de TodT implica igualmente la colaboración de cinco monómeros unidos a tres cajas distintas, en este caso adyacentes al promotor y no solapando con él, y de un dímero del activador IHF, para configurar la estructura funcional de la regulación. Esta estructura actúa como reclutadora de la ARNp, y la retiene firmemente hasta que la presencia del efector (fosfato) la libera y activa la transcripción del promotor. En este caso son las α -CTDs de la polimerasa las retenidas por TodT, las mismas que participan en la estabilización de los complejos de transcripción en los promotores P_N (*Azoarcus*) y A3 ($\phi 29$) mediante su interacción con el activador AcpR y con el regulador p4 (activador y represor).

De la comparación entre estos cuatro modelos de regulación se pueden inferir varios mecanismos comunes empleados para modelar la topología del ADN y modular la afinidad de la ARNp por el promotor. Estos mecanismos implican la localización de factores de transcripción en sitios adyacentes a la secuencia del promotor o solapados con ella y son:

- Unión cooperativa de varios factores de transcripción dando lugar a estructuras de orden superior. Mediante este mecanismo se consiguen una regulación eficiente, a pesar de la baja afinidad de los factores de transcripción por sus sitios de unión, y una respuesta rápida de silenciamiento ante un pequeño aumento de la concentración del represor.
- Unión cooperativa de proteínas reguladoras diferentes. Esto permite conectar señales reguladoras distintas.
- Modulación mediante especies efectoras. Esto permite establecer un control muy fino, sensible a pequeñas variaciones en las condiciones del medio.
- Modulación o competición entre un factor de transcripción y la ARNp por una misma secuencia.
- Modulación de la afinidad de la ARNp por el promotor mediante interacciones adicionales establecidas entre la ARNp y factores de transcripción situados en posiciones adyacentes, a través de sus subunidades α (α -CTD) y/o σ .

Surge la pregunta de cuál estrategia es más eficiente: la que implica la actuación coordinada de varias proteínas con baja afinidad por el ADN pero que se unen de forma cooperativa generando una estructura nucleoproteica de orden superior (como es el caso de BzdR y TodT y del sistema sinérgico de unión de p6 y p4), o la que induce una respuesta de silenciamiento o activación del promotor inmediata, dependiente de un efector externo que condiciona la afinidad (alta o nula) del regulador por el promotor (como es el caso de TtgV).

Comparando los dos virus análogos estudiados se observa que presentan distinto número de sitios de unión y de afinidades diferentes. Ø29 presenta cuatro sitios de unión de p4 mientras que Nf presenta solo dos, pero de mayor afinidad. La unión sucesiva de p6 desplaza la p4 de los dos sitios en el sistema de Ø29 ausentes en el de Nf. Cabe por tanto preguntarse si el número y la afinidad relativa de sitios de unión influyen en la sensibilidad del sistema de regulación.

La comparación entre sistemas de regulación similares podría permitir entender estos mecanismos desde un punto de vista de adaptación evolutiva.

Se han descrito otros casos de regulación similares a los aquí presentados, lo que apoya la hipótesis de que los mecanismos comunes

descritos en este trabajo pueden ser extensibles a otros sistemas de regulación transcripcional virales o bacterianos.

El modelo propuesto para la regulación del promotor *glnAp2* de *E. coli* es muy similar al aquí enunciado para el sistema de TodT (Rippe, 2000). El factor transcripcional NtrC cataliza el paso del complejo cerrado al abierto del sistema formado por la ARNp (con el factor σ^{54}) y este promotor. NtrC recibe el grupo fosfato de una histidina-quinasa, NtrB, que se autofosforila cuando se reduce la concentración de nitrógeno en el medio. Se trata de un sistema sensor de dos componentes, análogo al formado por TodT y TodS (otra histidina-quinasa). Además NtrC presenta actividad ATP-ásica.

NtrC es un dímero en solución que se une como tal dímero a dos sitios de alta afinidad, situados en las posiciones más distantes del promotor y a otros tres sitios de unión adicionales de muy baja afinidad, localizados en la secuencia separadora de las cajas anteriores y el promotor. La unión a estos sitios es cooperativa (**Figura V.5a**). Se han descrito además la participación en el proceso de regulación de un octámero de NtrC-P (NtrC fosforilada) capaz de interactuar con dos hebras de ADN simultáneamente, que interactúa con la ARNp, y la necesidad de la hidrólisis de ATP para dar lugar al complejo abierto. A partir de estos datos se propuso el modelo de *loop* representado en la **Figura V.5a** como la conformación funcional del complejo nucleoproteico regulador formado por NtrC-P, ARNp y el promotor *glnAp2* (Rippe, 2000). Experimentos de ME (Su *et al.*, 1990) y de AFM (Rippe *et al.*, 1997) realizados con anterioridad a la proposición de este modelo habían mostrado la estructura del complejo cerrado ARNp-ADN sobre el promotor (**Figura V.5c1**), la del complejo ternario NtrC-ARNp-ADN (**Figura V.5c2**) y la del complejo ARNp-ADN ya activado, cuando se ha perdido la interacción entre NtrC y la polimerasa (**Figura V.5c3**). Las estructuras caracterizadas apoyan el modelo propuesto posteriormente por K. Rippe.

La similitud entre los sistemas de NtrC y TodT es muy grande (Figuras V.5a-b). La disposición y tamaño de los sitios de unión (17 y 16pb respectivamente) y la diferente afinidad de las cajas en ambos sistemas es similar, permitiendo establecer correspondencias entre los sitios 1 y 2 de NtrC y las cajas 1 y 2 de TodT, y los sitios 3 y 4 de NtrC con la caja 3 de TodT y el sitio de unión del activador IHF. La secuencia entre los sitios de NtrC y el promotor presentan además varios *tracks* de As, como en la región del promotor P_{TodT}.

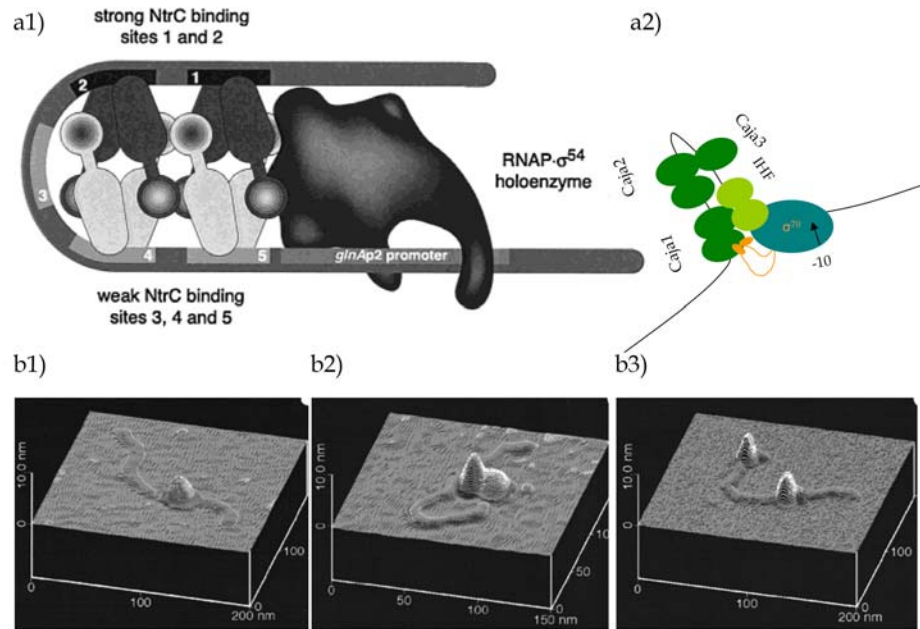


Figura V.5. Comparación entre los sistemas de regulación de NtrC y TodT. **a)** Modelo de regulación del promotor *glnAp2* de *E. coli* mediante el activador NtrC, extraído de: Rippe, 2000). Los dos sitios de unión de máxima afinidad se resaltan en oscuro y los tres de baja afinidad en claro. **b)** Modelo de regulación propuesto en esta tesis para TodT. **c)** Imágenes de AFM tomadas en aire del complejo cerrado formado por al ARNp con la subunidad σ^{54} y el ADN con la secuencia entorno al promotor *glnA* (**c1**), de un complejo ternario formado por la ARNp, el activador NtrC y el ADN (**c2**) y del complejo abierto ya despegado de NtrC (**c3**) (imágenes tomadas de Rippe *et al.*, 1997).

El modelo de K. Rippe no considera el posible papel reclutador de la ARNp de la estructura del complejo NtrC-ADN ni su resultante función “represora”. Sin embargo, sólo la hidrólisis posterior de ATP activa el sistema, lo que sugiere otra posible interpretación de los resultados apoyada por la analogía con el sistema de regulación de TodT aquí estudiado y con el modelo estructural del complejo nucleoproteico ADN-TodT-IHF sugerido por los resultados. En la **Figura V.5** se confrontan los modelos propuestos para los complejos de NtrC (**a**) y TodT (**b**) con el fin de mostrar la semejanza entre ellos. La reinterpretación del modelo de NtrC consiste en que más que activar el sistema lo que está haciendo la hidrólisis es des-reprimirlo, liberando la ARNp atrapada y permitiendo que forme el complejo abierto, como propuesto para la regulación de TodT. De esta forma la estructura de NtrC-ADN recluta y retiene la ARNp y por tanto NtrC es, como TodT, un represor. La posterior hidrólisis de ATP en

el sistema de NtrC y la posterior unión de fosfato en el sistema de TodT promueven un cambio conformacional de ambas proteínas por el que se anula su interacción con la ARNp.

Se ha querido exponer el sistema de NtrC, tan semejante al de TodT, para mostrar por un lado la posible reinterpretación de los datos del modelo publicado por K. Rippe a la luz del modelo propuesto en esta tesis para el sistema de TodT, y, por otro lado, para reafirmar la idea de que las estructuras y los mecanismos de regulación particulares (enteros o por partes) descritos en esta tesis, que como se ha visto, se repiten entre los sistemas estudiados, representan mecanismos generales de regulación transcripcional.

La modulación topológica del ADN por flexión o plegamiento en estructuras de tipo horquilla o de tipo lazo, o por formación de superestructuras, la cooperatividad de la unión, el reclutamiento de la polimerasa o su retención, son elementos que parecen coordinarse y adaptarse para optimizar los mecanismos de regulación transcripcional en distintos sistemas y organismos.

Browning y Busby finalizaban su revisión sobre la regulación de la transcripción bacteriana con la siguiente frase: *"We can but wonder at the solutions that have arisen, which are all simple, but very diverse. The general rule seems to be that there are no general rules!"* (Browning y Busby, 2004). El trabajo aquí presentado ilustra la diversidad de los mecanismos desarrollados para la regulación transcripcional y la relativa sencillez de los mismos, y muestra la gran sensibilidad con la que cada uno de ellos responde a los estímulos externos y la finura del control que ejercen, al conectarlas con la complejísima red de variables del entorno.

Queda además en el tintero entender cómo los cambios estructurales inducidos por los distintos efectores (tolueno, fosfato, Bz-CoA) en sus bolsillos de unión se transmiten a la totalidad de la estructura, lo que se enmarca dentro del apasionante capítulo de los cambios conformacionales de estructuras proteicas, y relaciona estos sistemas con el funcionamiento de las ATPasas de los motores moleculares (Oster y Wang, 2002; Bustamante *et al.* 2004), y entre ellos de estructuras tan complejas como las chaperoninas. Este aspecto no ha sido tratado en la presente memoria, pero ha constituido un incentivo y un motivo de avance durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

VI- CONCLUSIONES

- I. Las estructuras de los complejos nucleoproteicos reguladores de la transcripción estudiados en esta tesis tienen en común un cambio topológico del ADN inducido por la unión de proteínas reguladoras en torno a los promotores regulados. La reestructuración del ADN incluye su distorsión por simple flexión por la unión de un solo factor transcripcional y su plegamiento en estructuras cerradas de tipo horquilla o de tipo lazo por la unión simultánea de más de un factor transcripcional.
- II. La regulación por simple inducción de un ángulo implica la formación de un complejo de alta afinidad entre el regulador y el ADN en la zona del promotor regulado.
 - Un ejemplo de este tipo de estructura reguladora es el del sistema regulador del promotor P_{TtgGHI} en *Pseudomonas putida*, en el que el represor TtgV induce un ángulo de $57 \pm 3^\circ$ al unirse al ADN.
- III. La regulación por formación de estructuras más complejas implica la unión cooperativa de múltiples factores de transcripción con baja afinidad por sus sitios, igualmente situados en la región del promotor regulado. Incluyen la actuación coordinada de represores y activadores, o factores de transcripción que actúan alternada o simultáneamente como represores y/o activadores.
Ejemplos de estas estructuras reguladoras son los otros cuatro sistemas estudiados.
 - El sistema de regulación del promotor P_{TodX} de *Pseudomonas putida*, en el que el represor TodT y el activador IHF inducen un plegamiento del ADN en una estructura de tipo horquilla.
 - El sistema de regulación del promotor P_N de *Azoarcus sp. CIB*, en el que el represor BzdR se une en torno al promotor dando lugar a una superestructura compacta que pliega el ADN en una configuración de tipo lazo.
 - El sistema de regulación de la transición entre los estadios temprano y tardío del bacteriófago Ø29, que implica la reconfiguración de la región de los promotores en una estructura de tipo horquilla. Esta estructura, formada por el factor de transcripción p4 y estabilizada por la proteína nucleoidea p6, dificulta la unión de la ARNp a los promotores tempranos y favorece la unión al promotor tardío.

- El sistema de regulación del bacteriófago Nf, que incluye la formación de una estructura de tipo horquilla semejante a la descrita para Ø29 configurada por las proteínas p4_N y p6_N.
- IV. La estructura reguladora se localiza bien sobre la propia secuencia promotora o bien en posiciones adyacentes, de forma que afecta a la unión de la polimerasa por impedimento estérico o por interacciones con la polimerasa.
- la unión del tetrámero del represor TtgV de *Pseudomonas putida*, la nucleación de la superestructura de BzdR de *Azoarcus*, y la estructura de horquilla de Ø29 y Nf sobre el promotor central A2b ocurren sobre la secuencia promotora y la ocultan o distorsionan.
 - la horquilla formada por TodT e IHF de *Pseudomonas putida* y los extremos de las horquillas de Ø29 y Nf se forman en posiciones cercanas al promotor e interactúan directamente con las subunidades σ o α de la ARN-polimerasa, desestabilizando o estabilizando la interacción ARNp-ADN, o incluso reteniendo la ARNpolimerasa según el caso.

Todo esto sugiere que la función reguladora de estas estructuras consiste en modular la afinidad de la ARN-polimerasa por los sitios de reconocimiento del promotor.

- V. La unión de efectores reguladores externos induce cambios conformacionales en los factores de transcripción de los tres sistemas bacterianos estudiados que inciden en:
- la afinidad de los factores de la transcripción por el ADN (caso de TtgV) o en la estabilidad de la estructura nucleoproteica de orden superior que configuran (caso de BzdR), descubriendo así las secuencias antes ocultas o distorsionadas.
 - su interacción con la ARN-polimerasa (caso de TodT), liberándola de su estado retenido.

Estos datos apuntan a que la regulación adicional ejercida por efectores ambientales externos tiene como diana la propia acción reguladora de los factores de transcripción (conclusión IV), con la que modulan la afinidad de la ARN-polimerasa por los sitios de reconocimiento del promotor.

VII BIBLIOGRAFÍA

** muy interesante

•• muy útil para el diseño de experimentos

Abril A.M., Salas M., Andreu J.M., Hermoso J.M., Rivas G. (1997) **Phage phi29 protein p6 is in a monomer-dimer equilibrium that shifts to higher association states at the millimolar concentrations found in vivo.** *Biochemistry* 36 (39) 11901-8.

Abril A., Marco S., Carrascosa J.L., Salas M., Hermoso J.M. (1999). Oligomeric Structures of the Phage Phi29 Histone-like Protein p6. *J. Mol. Biol.* 292, 581-588.

Alcorlo M, González-Huici V, Hermoso JM, Meijer WJ, Salas M. (2007) **The phage phi29 membrane protein p16.7, involved in DNA replication, is required for efficient ejection of the viral genome.** *J. Bacteriol.* 189 (15) 5542-9.

Alcorlo M., Jiménez M., Ortega A., Hermoso JM, Salas M., Minton A., Rivas G. (2009) **Analytical ultracentrifugation studies of phage Phi29 protein p6 binding to DNA.** *J. Mol Biol.* 385(5), 1616-29.

Ali N.O., Jeusset J., Larquet E., Le Cam E., Belitsky B., Sonenshein A.L., Msadek T., Débarbouillé M. (2003) **Specificity of the interaction of RocR with the rocG-rocA intergenic region in *Bacillus subtilis*.** *Microbiology* 149 (3) 739-50.

** Ando T., Uchihashi T., Kodera N., Miyagi A., Nakakita R., Yamashita H., Sakshita M. (2006) **High-Speed Atomic Force Microscopy for Studying the Dynamic Behavior of Protein Molecules at Work.** *Japanese Journal of Applied Physics* 45 (3B), 1897-1903.

Azam T.A., Ishihama A. (1999) **Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity.** *J. Biol. Chem.* 274 (46), 33105-13.

Badía, D., Camacho, A., Pérez-Lago, L., Escandón, C., Salas, M., Coll, M. (2006) **The structure of phage phi29 transcription regulator p4-DNA complex reveals an N-hook motif for DNA binding.** *Molecular Cell* 22, 73-81.

Baró, A. M., Miranda, R., Alamán, J., García, N., Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Carrascosa, J.L. (1985). **Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy.** *Nature* 315(6016), 253-4.

Barragán MJ, Blázquez B, Zamarro MT, Mancheño JM, García JL, Díaz E, Carmona M. (2005) **BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators.** *J Biol Chem.* 280(11):10683-94.

Barragán MJ, Carmona M, Zamarro MT, Thiele B, Boll M, Fuchs G, García JL, Díaz E. (2004) **The bzd gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB.** *J Bacteriol.* 186(17):5762-74.

Berquanda A., Mingeot-Leclercq M., Dufrène Y. (2004) **Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1664, 198– 205.

Binnig, G., Quate C.F., Gerber C.. **Atomic Force Microscope.** *Physical Review Letters*, 1986. 56(9), 930-933.

Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., Weibel E., (1982) **Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy** *Physical Review Letters*, 49, 57-61.

VII. Bibliografía

- ** Bustamante C., Chemla Y.R., Forde N., Izhaky D. (2004) **Mechanical processes in Biochemistry**, *Annual Review of Biochemistry* 73, 705-748.
- ** Browning D., Busby S. (2004) **The regulation of bacterial transcription initiation** *Nature Reviews Microbiology* 2:1-9. (Review)
- Brujic J, Hermans RIZ, Garcia-Manyes S, Walther K, Fernandez JM. (2007) **Dwell-time distribution analysis of polypeptide unfolding using forceclamp spectroscopy**. *Biophys. J.*; 92, 2896-903.
- Busch A, Lacal J, Martos A, Ramos JL, Krell T. (2007) **Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(34):13774-9
- Busch A, Guazzaroni ME, Lacal J, Ramos JL, Krell T. (2009) **The sensor kinase TodS operates by a multiple step phosphorelay mechanism involving two autokinase domains**. *J Biol Chem*. 284 (16), 10353-60.
- ** Butt H.J. Cappella B., Kappl M. (2005) **Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications**. *Surface Science Reports* 59, 1-152.
- ** Calladine C., Drew H., Luisi B., Travers A. **Understanding DNA: The Molecule and How it Works**. (3ª Edición) *Elsevier Academic Press*, 2004, Londres (Reino Unido).
- Camacho A. y Salas M. (2001a) **Mechanism for the switch of Phi29 DNA early to late transcription by regulatory protein p4 and histone-like protein p6**. *EMBO J*. 20 (21), 6060-6070.
- Camacho A. y Salas M. (2001b) **Repression of Bacteriophage Phi29 early promoter C2 by viral protein p6 is due to impairment of closed complex**. *J.Biol.Chem*. 276 (31), 28927-28932.
- ** Camacho A. y Salas M. (2004) **Molecular Interplay Between RNA Polymerase and Two Transcriptional Regulators in Promoter Switch**. *JMB* 336, 357-368.
- Cappella B., Dietler G. (1999) **Force-distance curves by atomic force microscopy**. *Surface Science Reports*, 34, (1-3), 1-104.
- Carrasco C., Carreira A., Schaap I., Serena P., Gómez-Herrero J., Mateu M., de Pablo P. J. (2006) **DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus** *PNAS* vol. 103 (37) 13706-13711.
- ** Carrasco C., Castellanos M., de Pablo P. J., García-Mateu M. (2008). **Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 4150-4155.
- ** Carrasco C. (2008). **Caracterización estructural y mecánica de nanosistemas biológicos mediante microscopía de fuerzas atómicas**. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis Doctoral.
- Carrascosa J.L., Llorca O., Valpuesta J.M. (2001) **Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins**. *Micron* 32, 43-50
- Carrión-Vázquez M., Andrés Oberhauser, Héctor Díez, Rubén Hervás, Javier Oroz, Jesús Fernández, David Martínez-Martín (2006) **Protein Nanomechanics as Studied by AFM Single-Molecule Force Spectroscopy** *Advanced Techniques in Biophysics*, pp. 163-245. Review
- Cellai S, Mangiarotti L, Vannini N, Naryshkin N, Kortkhonja E, Ebricht RH, Rivetti C. **Upstream promoter sequences and alphaCTD mediate stable DNA wrapping within the RNA polymerase-promoter open complex**. *EMBO Rep*. 2007 (3) 271-8.
- Ceschini S., Lupidi G., Coletta M., Pon C.L., Fioretti E., Angeletti M. (2000) **Multimeric self-assembly equilibria involving the histone-like protein H-NS. A thermodynamic study**. *J. Biol. Chem*. 275 (2) 729-34.

VII. Bibliografía

- Cohen S., Bitler A. (2008) **Use of AFM in bio-related systems.** *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13, 316–325. (Review).
- Crampton N., Bonass W., Kirkham J, Rivetti C., Thomson N. (2006) **Collision events between RNA polymerases in convergent transcription studied by atomic force microscopy.** *Nucleic Acids Research*, 00 (0), 1-10.
- ** Crampton N, Yokokawa M, Dryden DT, Edwardson JM, Rao DN, Takeyasu K, Yoshimura SH, Henderson RM. (2007) **Fast-scan atomic force microscopy reveals that the type III restriction enzyme EcoP15I is capable of DNA translocation and looping.** *Proc Natl Acad Sci U S A*.104 (31) 12755-60.
- ** Czajkowsky DM, Shao Z. (2003) **Inhibition of protein adsorption to muscovite mica by monovalent cations.** *J Microsc.* 211, 1-7.
- Czajkowsky D., Hotze E., Shao Z., Tweten (2004) **Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane β -hairpins to the membrane** *EMBO* 23, 3206-3215.
- Daly S., Przybycien T., Tilton R. (2003) **Coverage-Dependent Orientation of Lysozyme Adsorbed on Silica.** *Langmuir*, 19 (9), 3848–3857.
- Dame R., Wyman C., Goosen N. (2001) **Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA.** *Biochimie* 83, 231-234.
- Dame R.T., Wyman C., Wurm R., Wagner R., Goosen N. (2002). **Structural Basis for H-NS-mediated Trapping of RNA Polymerase in the Open Initiation Complex at the rrnB P1.** *J.Biol.Chem.* 277, (3), 2146–2150.
- ** Dame R.T., Wyman C., Goosen N. (2003) **Insights into the regulation of transcription by scanning force Microscopy.** *Journal of Microscopy*, 212, 244–253. Review
- ** Dame R.T. (2005a) **The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin** *Molecular Microbiology* 56 (4), 858–870. Review
- ** Dame R.T., van Mameren J., Luijsterburg M.S., Mysiak M.E., Janicijevic A., Pazdzior G., van der Vliet P., Wyman C., Wuite G. (2005b). **Analysis of scanning force microscopy images of protein-induced DNA bending using simulations** *Nucleic Acids Research*, 33, 7.
- ** de Pablo P. J., Schaap I. A.T., MacKintosh F. C., Schmidt C. F. (2003) **Deformation and Collapse of Microtubules on the Nanometer Scale.** *Phys.Rev.Lett.* 91, 098101-4.
- Dodson M. y Echols H. (1991) **Electron Microscopy of protein-DNA complexes.** *Methods in enzymology* 208, 168-96.
- Dunn,T.M., Hahn,S., Ogden,S. and Schleif,R.F. (1984) **An operator at -280 base pairs that is required for repression of araBAD operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5017-5020.
- Durante-Rodríguez G., Zamarro M.T., García J.L., Díaz E., Carmona M. (2006) **Oxygen-dependent regulation of the central pathway for the anaerobic catabolism of aromatic compounds in Azoarcus sp. strain CIB.** *J Bacteriol.* 188 (7) 2343-54.
- Durante-Rodríguez G., Zamarro M.T., García J.L., Díaz E., Carmona M. (2008) **New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in Azoarcus sp. CIB.** *Microbiology.* 154: 306-16.
- Erie DA, Yang G, Schultz HC, Bustamante C. (1994) **DNA bending by Cro protein in specific and nonspecific complexes: implications for protein site recognition and specificity.** *Science*, Vol 266, Issue 5190, 1562-1566

VII. Bibliografía

- Fillet S., Vélez M., Lu D., Zhang X., Gallegos M.T., Ramos J.L. (2009) **TtgV represses two different promoters by recognizing different sequences.** *J Bacteriol.* 191 (6) 1901-9.
- Fotiadis D., Qian P., Philippsen A., Bullough P.A., Engel A., Hunter N. (2004) **Structural Analysis of the Reaction Center Light-harvesting Complex I Photosynthetic Core Complex of *Rhodospirillum rubrum* using Atomic Force Microscopy.** *JBC* 279, 2063-2068.
- Freire, R., Salas, M., Hermoso, J. M. (1994). **A new protein domain for binding to DNA through the minor groove.** *EMBO J.* 13, 4353-4360.
- ** García R., Pérez R. (2002) **Dynamic atomic force methods.** *Surface Science Reports* 47, 197-301. (review)
- ** Gibson C.W., Thomson N.H., Abrams W.R., Kirkham J. (2005) **Nested genes: biological implications and use of AFM for analysis.** *Gene.* Apr 25;350(1):15-23. Review
- ** Gonçalves R., Scheuring S. (2006) **Manipulating and imaging individual membrane proteins by AFM.** *Surf. Interface Anal.* 2006; 38: 1413-1418. (Review)
- González-Huici V., Alcorlo M., Salas M., Hermoso J.M. (2004) **Phage phi29 proteins p1 and p17 are required for efficient binding of architectural protein p6 to viral DNA in vivo.** *J. Bacteriol.* 186 (24) 8401-6.
- González-Huici V., Salas M., Hermoso J.M. (2006) **Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage phi29 DNA ejection.** *Gene* 7; 374, 19-25.
- Gorman J., Greene E. (2008) *Nat. Struct. Molec. Biol.* **Visualizing one-dimensional diffusion of proteins along DNA.** 15, 768-774.
- Goyal S., Lillian T., Blumberg S., Meiners J.C., Meyöfer E., Perkins N.C. (2007) **Intrinsic curvature of DNA influences LacR-mediated looping.** *Biophysical J.* 93, 4342-4359.
- Guazzaroni M.E., Terán W., Zhang X., Gallegos M.T., Ramos J.L. (2004) **TtgV bound to a complex operator site represses transcription of the single promoter for the multidrug and solvent extrusion TtgGHI pump.** *J. Bacteriol.*, 186 (10) 2921-2927.
- Guazzaroni M.E., Krell T., Felipe A., Ruiz R., Meng C., Zhang X., Gallegos M.T., Ramos J.L. (2005) **The multidrug efflux regulator TtgV recognizes a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA. Evidence from isothermal titration calorimetry.** *J. Biol. Chem.*, 280, 20887-20893.
- Guazzaroni M.E., Krell T., Gutiérrez del Arroyo P., Vélez M., Jiménez M., Rivas G., Ramos J.L. (2007a) **The transcriptional repressor TtgV recognizes a complex operator as a tetramer and induces convex DNA bending.** *J. Mol. Biol.* 369 (4) 927-39.
- Guazzaroni M.E., Gallegos M.T., Ramos J.L., Krell T. (2007b) **Different modes of binding of mono- and biaromatic effectors to the transcriptional regulator TTGV: role in differential derepression from its cognate operator.** *J. Biol. Chem.* 282 (22), 16308-16.
- Gupta R., Stallcup R., Zyvex Corporation (2006) **Physical Property Characterization of Nanotubes, Nanowires, and Nanocoils Using a Zyvex S100 Nanomanipulator System.** ZYVEX APPLICATION NOTE 9707.
- ** Guthold M, Zhu X., Rivetti C., Yang G, Thomson N., Kasas S., Hansma H., Smith B., Hansma P., Bustamante C. (1999) **Direct Observation of One-Dimensional Diffusion and Transcription by *Escherichia coli* RNA Polymerase.** *Biophysical J.* 77, 2284-2294.
- Gutiérrez C., Freire R., Salas M., Hermoso J.M. (1994) **Assembly of phage Phi29 with viral protein p6 into a compact complex** *EMBO J.* 13 (1) 269-276.

VII. Bibliografía

- Gutsche I., Essen L.O., Baumeister W. (1999) **Group II Chaperonins: New TRiC(k)s and Turns of a Protein Folding Machine.** *JMB* 293, 295-312.
- Hansma H., Laney D. (1996) **DNA Binding to Mica Correlates with Cationic Radius: Assay by Atomic Force Microscopy** *Biophysical Journal* Vol. 70, 1933-1939.
 - Hansma H. (2001) **Surface biology of DNA by atomic force microscopy.** *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52:71-92. (Review)
 - ** Herbert, K.M., La, P.A., Wong, B.J., Mooney, R.A., Neuman, K.C., Landick, R., Block, S.M. (2006) **Sequence-resolved detection of pausing by single RNA polymerase molecules.** *Cell* 125; 1083-1094.
- Hinkle D.C., Chamberlin M.J. (1972). **Studies of the binding of Escherichia coli RNA polymerase to DNA. I. The role of sigma subunit in site selection.** *J. Mol. Biol.* 70 (2) 157-185.
- Hinterdorfer P., Schilcher K., Baumgartner W., Gruber HJ., Schindler H. (1998) **A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by AFM.** *Nanobiology* 4, 177-188.
- ** Hinterdorfer P., Dufrène Y. (2006) **Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy.** *Nature Methods* 3 (5) 347-355. (Review)
 - Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baró A.M. (2007) **WSxM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology.** *Rev. Sci. Instrum.* 78, 013705.
 - ** Hörger I, Velasco E, Rivas G, Vélez M, Tarazona P. (2008) **FtsZ bacterial cytoskeletal polymers on curved surfaces: the importance of lateral interactions.** *Biophys J.* 94 (11) 81-83.
 - Israelachvili J.N. **Intermolecular and Surface Forces.** Academic Press, 1998, Londres.
 - ** Ivanovska I., de Pablo P.J., Ibarra B., Sgalari G., MacKintosh C., Carrascosa J.L., Schmidt C., Wuite G. (2004) **Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties** *PNAS* vol. 101 (20) 7600-7605
 - ** Janovjak H., Struckmeier J., Hubain M., Kedrov A., Kessler M., Müller D., (2004) **Probing the Energy Landscape of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin** *Structure*, 12, 871-879.
- Kalodimos CG, Bonvin AM, Salinas RK, Wechselberger R, Boelens R, Kaptein R. (2002) **Plasticity in protein-DNA recognition: lac repressor interacts with its natural operator O1 through alternative conformations of its DNA-binding domain.** *EMBO J.* 21 (12) 2866-76.
- ** Kapanidis A., Margeat E., Ho S., Kortkhonja E., Weiss S., Ebright R. (2006) **Initial Transcription by RNA Polymerase Proceeds Through a DNA-Scrunching Mechanism** *Science* 314. (5802), 1144-1147.
- Kar S., Adhya S. (2001) **Recruitment of HU by piggyback: a special role of GalR in repressosome assembly.** *Genes and Dev.* 15: 2273-2281
- ** Kasas S, Thomson NH, Smith BL, Hansma HG, Zhu X, Guthold M, Bustamante C, Kool ET, Kashlev M, Hansma PK. (1997) **Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy.** *Biochemistry*; 36 (3) 461-8.
- Kienberger F., Kada G., Gruber H. J., Pastushenko P., Riener C., Trieb M., Knaus H.G., Schindler H., Hinterdorfer P. (2000) **Recognition Force Spectroscopy Studies of the NTA-His₆ Bond.** *Single Molecules* 1, 25-31.

VII. Bibliografía

- Krell, T., Molina-Henares, A. J. & Ramos, J. L. (2006). **The IclR family of transcriptional activators and repressors can be defined by a single profile.** *Protein Science* 15, 1207–1213.
- Lacal J, Busch A, Guazzaroni ME, Krell T, Ramos JL. (2006) **The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103 (21) 8191-6.
- Lacal J, Guazzaroni ME, Busch A, Krell T, Ramos JL. (2008a) **Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the tod pathway operon promoter.** *J Mol Biol.* 376 (2) 325-37.
- Lacal J, Guazzaroni ME, Gutiérrez-del-Arroyo P, Busch A, Vélez M, Krell T, Ramos JL. (2008b) **Two levels of cooperativeness in the binding of TodT to the tod operon promoter.** *J Mol Biol.* 384 (5) 1037-47.
- Lia G., Semsey S., Lewis D., Adhya S., Bensimon D., Dunlap D., Finzi F. (2008) **The antiparallel loops in gal DNA.** *Nucleic Acids Research* 36 (12) 4204–4210.
- • Liu Z, Li Z, Zhou H, Wei G, Song Y, Wang L. (2005) **Imaging DNA Molecules on Mica Surface by Atomic Force Microscopy in Air and in Liquid.** *Microsc Res Tech.*; 66 (4), 179-85
- ** Lower B., Ruchirej Yongsunthon, Liang Shi, Linda Wildling, Hermann J. Gruber, Nicholas S. Wigginton, Catherine L. Reardon, Grigoriy E. Pinchuk, Timothy C. Droubay, Jean-François Boily, and Steven K. Lower (2009) **Antibody-recognition force microscopy shows that outer membrane cytochromes OmcA and MtrC are expressed on the exterior surface of *Shewanella oneidensis* MR-1.** *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.02108-08
- ** Llorca O., Smyth M.G., Carrascosa J.L., Willison K., Radermacher M., Steinbacher S., Valpuesta J.M. (1999) **3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin.** *Nature structural biology*, 6 (7), 639-642.
- Llorca O., Martín-Benito J., Grantham J., Ritco-Vonsovici M., Willison K., Carrascosa J.L., Valpuesta J.M. (2001) **The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin.** *EMBO J.* 20, 4065-4075
- Lyubchenko YL, Shlyakhtenko LS, Aki T, Adhya S. (1997) **Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GalR and HU.** *Nucleic Acids Res.*; 25 (4), 873-6.
- Martín-Benito J., Boskovic J., Gómez-Puertas P., Carrascosa J. L., Simons T. Lewis S., Bartolini F., Cowan N., Valpuesta J. M. (2002) **Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT.** *EMBO Journal* 21 (23), 6377-6386.
- Martín-Benito J., Bertrand S., Hu T., Ludtke P., McLaughlin J., Willardson B, Carrascosa J.L., Valpuesta J.M. (2004) **Structure of the complex between the cytosolic chaperonin CCT and phosducin-like protein.** *PNAS* 101 (50).
- ** Martín-Benito J., Grantham J., Boskovic J., Brackley K., Carrascosa J. L., Willison K., Valpuesta J. M. (2007a) **The inter-ring arrangement of the cytosolic chaperonin CCT.** *EMBO reports* Vol 8 (3) 252-257.
- Martín-Benito J., Gómez-Reino J., Stirling P., Lundin VF, Gómez-Puertas P., Boskovic J., Chacón P., Fernández J. J., Berenguer J., Leroux M. R., Valpuesta J. M. (2007b) **Divergent substrate-binding mechanisms reveal an evolutionary specialization of eukaryotic prefoldin compared to its archaeal counterpart.** *Structure*, 15 (1), 101-10.
- ** Maurer S., Fritz J., Muskhelishvili G., Travers A. (2006) **RNA polymerase and an activator form discrete subcomplexes in a transcription initiation complex.** *EMBO J.* 25, 3784-3790.

VII. Bibliografía

- ** McLeod S., Johnson R. (2001) **Control of transcription by nucleoid proteins.** *Current Opinion in Microbiology*, 4, 152-159. (Review)
- McLeod S.M.; Aiyar S.E.; Gourse R.L.; Johnson R.C. (2002). **The C-terminal domains of the RNA polymerase α -subunits: contact site with fis and localization during co-activation with CRP at the Escherichia coli proP P2 promoter.** *JMB* 316 (3) 517-529.
- Meijer W., Horcajadas J., Salas M. (2001) **Phi29 family of Phages.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2) 261-287.
- Mellado R.P., Barthelemy I., Salas M. (1986) **In vitro transcription of bacteriophage phi 29 DNA. Correlation between in vitro and in vivo promoters.** *Nucleic Acids Res.* 14 (12), 4731-4741.
- Mendieta J., Pérez-Lago L., Salas M., Camacho A. (2007) **DNA sequence-specific recognition by a transcriptional regulator requires indirect readout of A-tracts.** *Nucleic Acids Res.* 35: 3252-3261.
- Mingorance J, Tadros M, Vicente M, González JM, Rivas G, Vélez M. (2005) **Visualization of single Escherichia coli FtsZ filament dynamics with atomic force microscopy.** *J Biol Chem.* 280 (21), 20909-14.
- Molina-Henares AJ, Krell T, Eugenia Guazzaroni M, Segura A, Ramos JL. (2006) **Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors.** *FEMS Microbiol Rev.* 30(2):157-86. (Review)
- Moreno-Herrero F, Herrero P, Colchero J, Baró AM, Moreno F. (2001) **Imaging and mapping protein-binding sites on DNA regulatory regions with atomic force microscopy.** *Biochem Biophys Res Commun.*; 280(1):151-7.
- Moreno-Herrero F., de Pablo P.J., Fernández-Sánchez R., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baró A.M. (2002) **Scanning force microscopy jumping and tapping modes in liquids.** *APPLIED PHYSICS LETTERS* 81 (14), 2620-2622.
- Moreno-Herrero F., Colchero J., Baró A.M. (2003a) **DNA height in Scanning force microscopy.** *Ultramicroscopy* 96, 167-174.
- Moreno-Herrero F., de Pablo P.J., Gómez-Herrero J., Colchero J., Baró A.M. (2003b) **Jumping mode scanning force microscopy: a suitable technique for imaging DNA in liquids.** *Applied Surface Science* 210, 22-26.
- Moreno-Herrero F., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baró A.M. (2004) **Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids** *Phys.Rev. E* 69, 031915-9.
- Mou J., Sheng S., Ho R., Shao Z. (1996) **Chaperonins GroEL and GroES: Views from AFM.** *Biophys J.* 71, 2213-2221.
- Müller D., Amrein M., Engel A. (1997a) **Adsorption of Biological Molecules to a solid support for Scanning Probe Microscopy.** *JSB* 119, 172-188.
- Müller D., Engel A., Carrascosa J.L., Vélez M. (1997b). **The bacteriophage f29 head-tail connector imaged at high resolution with the atomic force microscope in buffer solution.** *EMBO J.* 16 (10) 2547-2553.
- Müller D., Fotiadis D., Scheuring S., Müller S., Engel A. (1999) **Electrostatically balanced subnanometer imaging of Biological specimens by AFM.** *Biophys.J.*, 76, 1101-1111.
- Müller D., Hand G.M., Engel A., Sosinsky G., Anderson K. (2002a) **Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26gap junctions.** *EMBO J.* 21 (14), 3598-3607.

VII. Bibliografía

- Müller D., Janovjak H., Lehto T., Kuerschner L., Anderson K. (2002b) **Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM.** *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 79, 1-43. (Review)
- ** Müller D., Fotiadis D., Scheuring S., Möller C., Engel A. (2002c) **Conformational Changes, Flexibilities and Intramolecular Forces Observed on Individual Proteins Using AFM.** *EMBO J.* 21, 3598-3607.
- ** Murakami KS, Masuda S, Campbell EA, Muzzin O, Darst SA. (2002). **Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex.** *Science* 296:1285-1290.
- Osman M.A., Moor C., Caseri W.R., Suter U.W. (1999) **Alkali metals ion exchange on muscovite mica.** *J. Colloid. Inter. Sci.* 209, 232-239.
- Osman M.A., Suter U.W. (2000) **Determination of the cation-exchange capacity of muscovite mica.** *J. Colloid. Inter. Sci.* 224, 112-115.
- ** Oster G., Wang H. **How protein motors convert chemical energy into Mechanical Work.** "Molecular Motors" ed. M. Schliwa, J. Wiley, 2002, München (Alemania).
- Pallandre A., Meersman B., Blondeau F., Nysten B., Jonas A. (2005) **Tuning the Orientation of an Antigen by Adsorption onto Nanostriped Templates.** *J. Am. Chem. Soc.* 127 (12), 4320-4325.
- Pastré D, Piétrement O, Fusil S, Landousy F, Jeusset J, David M, Hamon L, Le Cam E, Zozime A. (2003). **Adsorption of DNA to Mica Mediated by Divalent Counterions: A Theoretical and Experimental Study.** *Biophysical Journal* 85:2507-2518.
- Pastré D., Hamon L., Landousy F., Sorel I., David M.O., Zozime A., Le Cam E., Piétrement O. (2006) **Anionic Polyelectrolyte Adsorption on Mica Mediated by Multivalent Cations: A Solution to DNA Imaging by Atomic Force Microscopy under High Ionic Strengths.** *Langmuir*, 22, 6651-6660.
- Pérez Lago L., Salas M., Camacho A. (2005a) **A precise DNA bend angle is essential for the function of the phage Phi29 transcriptional regulator.** *Nucleic Acids Research* 33, 126-134.
- Pérez Lago L., Salas M., Camacho A. (2005b) **Homologies and Divergences in the Transcription Regulatory System of Two Related *Bacillus subtilis* Phages.** *J. of Bacteriology* Vol. 187, No. 18.
- Piétrement O., Pastré D., Fusil S., Jeusset J., David M.O., Landousy F., Hamon L., Zozime A., Le Cam E. (2003) **Reversible Binding of DNA on NiCl₂-Treated Mica by Varying the Ionic Strength.** *Langmuir*, 19 (7), 2536-2539.
- Prieto I., Serrano M., Lazaro J.M., Salas M., Hermoso J.M. (1988) **Interaction of the Bacteriophage phi 29 Protein p6 with Double-Stranded DNA;** *PNAS* 85 314-318.
- Rees W., Keller R., Vesenska JP., Yang G., Bustamante, C. (1993) **Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by Scanning Force Microscopy.** *Science*, 260 (5114) 1646-1649
- Révet B. y Fourcade A. (1998) **Short unligated sticky ends enable the observation of circularised DNA by atomic force and electron microscopes.** *Nucleic Acids Res.*, 26, 2092-2097.
- Révet B., von Wilcken-Bergmann B., Bessert H., Barker A., Müller-Hill B. (1999) **Four dimers of λ repressor bound to two suitably spaced pairs of λ operators form octamers and DNA loops over large distances.** *Current Biology*, 9 (3) 150-154.
- Reviakine I., Wilma Bergsma-Schutter, Christine Mazeres-Dubut, Natalia Govorukhina, and Alain Brisson (2000). **Surface Topography of the p3 and p6 Annexin V Crystal Forms Determined by Atomic Force Microscopy** *Journal of Structural Biology* 131, 234-239 (2000)

VII. Bibliografía

- Rippe K., Guthold M., von Hippe P.H., Bustamante C. (1997) **Transcriptional Activation via DNA-looping: Visualization of Intermediates in the Activation Pathway of E. coli RNA Polymerase σ^{54} Holoenzyme by Scanning Force Microscopy.** *J. Mol. Biol.* 270, 125-138.
- ** Rippe K. (2000) **Simultaneous Binding of Two DNA Duplexes to the NtrC-Enhancer Complex Studied by Two-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy.** *Biochemistry.* 39 (9), 2131-2139.
- Rivetti. C., Walker C., Bustamante C. (1998) **Polymer chain statistics and conformational analysis of DNA molecules with bends or sections of different flexibility.** *J. Mol. Biol.*, 280, 41-59.
- Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C. (2003) **Visualizing RNA Extrusion and DNA Wrapping in Transcription Elongation Complexes of Bacterial and Eukaryotic RNA Polymerases.** *JMB* 326, 1413-1426.
- Rivetti C. y Guthold M. (2003) **Single DNA Molecule Analysis of Transcription Complexes.** *Methods in Enzimology* 371, 34. (Review)
- Rojas, A., Segura, A., Guazzaroni, M.E., Terán, W., Hurtado, A., Gallegos, M. T. and Ramos, J.L. (2003) **In vivo and in vitro evidences that TtgV is the local specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*.** *J. Bacteriol.*, 185, 4755-4763
- Rojo F, Zaballos A, Salas M. (1990) **Bend induced by the phage Phi29 transcriptional activator in the viral late promoter is required for activation.** *J. Mol. Biol.* 211, 713-725.
- Rojo F. (2001) **Mechanisms of transcriptional repression.** *Curr Opin Microbiol.* 4 (2), 145-51. (Review)
- ** Saiz L., Rubi J.M., Vilar J.M.G. (2005) **Inferring the in vivo looping properties of DNA.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 17642-17645.
- ** Saiz L. and Vilar JMG (2006) **DNA looping: the consequences and its control.** *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 344-350
- ** Sánchez D., Uma Anandb, Julia Gorelik c, Christopher D. Benhamd, Chas Bountra d, Laba M., David Klenerman e, Rolfe Birch b, Praveen Anandb,**, Yuri Korchev (2007) **Localized and non-contact mechanical stimulation of dorsal root ganglion sensory neurons using scanning ion conductance microscopy.** *Journal of Neuroscience Methods* 159, 26-34
- SantaLucia J., Hicks D. (2004) **The thermodynamics of DNA structural motifs** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 415-40.
- Sarai A., Kono H. (2005) **Protein-DNA recognition patterns and predictions.** *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 34, 379-398.
- Schaap I., de Pablo P.J., Schmidt C.F. (2004) **Resolving the molecular structure of microtubules under physiological conditions with scanning force microscopy.** *Eur.Biophys. J.* 33: 462-467
- Schaap I., Carrasco C., de Pablo P.J., MacKintosh F., Schmidt C.F. (2006) **Elastic Response, Buckling, and Instability of Microtubules under Radial Indentation.** *Biophysical Journal* 91, 1521-1531.
- Scheuring S., Ringler P., Borgnia M., Stahlberg H., Müller D., Agre P., Engel A (1999) **High resolution AFM topographs of the Escherichia coli water channel aquaporin Z.** *EMBO J* 18, 4981-4987.
- ** Scheuring S., Seguin J., Marco S., Lévy D., Robert B., Rigaud J.L (2003) **Nanodissection and high-resolution imaging of the Rhodospseudomonas viridis photosynthetic core complex in native membranes by AFM.** *PNAS* 100, 1690-1693.

VII. Bibliografía

- ** Scheuring S., Boudier T., Sturgis J. (2007) **From high-resolution AFM topographs to atomic models of supramolecular assemblies** *Journal of Structural Biology* 159, 268–276.
- Schleif, R. (1992) **DNA looping**. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 199–223.
- Schoehn G., Hayes M., Cliff M., Clarke A., Saibil H. (2000) **Domain Rotations Between Open, Closed and Bullet-shaped Forms of the Thermosome, an Archaeal Chaperonin**. *J. Mol. Biol.* 301, 323–332.
- Schroeder O., Wagner R. (2000) **The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex**. *J. Mol. Biol.* 296, 248–259.
- Schumacher M. A., Allen G. S., Diel M., Seidel G., Hillen, W., Brennan, R. G. (2004) **Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P**. *Cell*, 118, 731–741.
- ** Schwaiger I., Schleicher M., Noegel A., Rief M. (2005) **Folding pathway of a fast-folding immunoglobulin**. *EMBO reports* 6, 46–51.
- Seelert H., Dencher N., Müller D. (2003) **Fourteen Protomers Compose the Oligomer III of the Proton-rotor in Spinach Chloroplast ATP Synthase**. *J. Mol. Biol.* 333, 337–344
- Seixas C., Casalou C., Viseu Melo L., Nolasco S., Brogueira P., Soares H. (2003) **Subunits of the chaperonin CCT are associated with *Tetrahymena* microtubule structures and are involved in cilia biogenesis** *Experimental Cell Research* 290 303–321
- Semsey S, Tolstorukov MY, Virnik K, Zhurkin VB, Adhya S. (2004) **DNA trajectory in the Gal repressosome**. *Genes Dev.* 18 (15), 1898–907.
- Seong GH, Kobatake E., Miura K., Nakazawa A., Aizawa M. (2002) **Direct Atomic Force Microscopy Visualization of Integration Host Factor-Induced DNA Bending Structure of the Promoter Regulatory Region on the *Pseudomonas* TOL Plasmid**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 361–366.
- Serrano M., Gutiérrez C., Salas M., Hermoso J.M. (1993) **Superhelical path of the DNA in the nucleoprotein** *J.Mol.Biol.* 230, 248–259.
- ** Shevchuk A., Frolenkov G., Sánchez D., James P., Freedman N., Lab M., Jones R., Klennerman D., Korchev Y. (2006) **Imaging Proteins in Membranes of Living Cells by High-Resolution Scanning Ion Conductance Microscopy** *Angewandte Chemie International Edition* Vol 45, (14), Pages 2212 – 2216.
- Shin M, Song M, Rhee JH, Hong Y, Kim YJ, Seok YJ, Ha KS, Jung SH, Choy HE. (2005) **DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of Esigma70 as a cofactor for looping**. *Genes Dev.* 19(19), 2388–98.
- ** Sorel I., Piétrement O., Hamon L., Baconnais S., Le Cam E., Pastré D. (2006) **The EcoRI-DNA complex as a model for investigating protein-DNA interactions by atomic force microscopy**. *Biochemistry*; 45(49), 14675–82.
- Su W., Porter S., Kustu S., Echols H. (1990) **DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial glnA promoter**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (14), 5504–5508.
- ** Swigon D., Coleman B., Olson W. (2006) **Modeling the Lac repressor-operator assembly: The influence of DNA looping on Lac repressor conformation** *PNAS* 103 (26) 9879–9884.
- Thomson N.H., Kasas S., Smith B. Hansma H.G., Hansma P.K. **Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging**. *Langmuir*, 12 (24), 5905–5908.

VII. Bibliografía

- ** Travers A., Bucle M. (Editores) **DNA-protein interactions. A Practical Approach.** Oxford University Press; 2000, Nueva York (EEUU).
- Valdrè G., Antognozzi M., Wotherspoon A., Miles M. (2004) **Influence of the properties of layered silicate minerals on adsorbed DNA surface affinity, self-assembly and nanopatterning.** *Philosophical Magazine Letters* 84 (7) 539-545.
- ** Valle F., DeRose J.A., Dietler G., Kawe M., Plückthun A., Semenza G. (2001) **Imaging the native structure of the chaperone protein GroEL without fixation using atomic force microscopy.** *Journal of Microscopy*, 203, 195-198.
- Valle F. (2003) **Study of biomacromolecule conformational changes by Scanning Force Microscopy.** Université de Lausanne. Tesis Doctoral.
- van Noort J., Verbrugge S., Goosen N., Dekker C., Dame RT. (2004) **Dual architectural roles of HU: Formation of flexible hinges and rigid filaments.** *PNAS*, 101 (18) 6969-6974.
- Viani MB., Pietrasanta LI., Thompson JB., Chand A., Gebeshuber IC., Kindt JH., Richter M., Hansma HG., Hansma PK. (2000) **Probing protein-protein interactions in real time.** *Nat. Str.Bio.* 7, 644-647.
- Vilar J.M.G., Leibler S. (2003) **DNA looping and physical constraints on transcription regulation.** *J. Mol. Biol.*, 331, 981-989.
- ** Vilar J.M.G., Saiz L. (2005) **DNA looping in gene regulation: from the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15, 136-144.
- Vinckier A., Heyvaert I., D'Hoore A., McKittrick T., Van Haesendonck C., Engelborghs Y., Hellemans L. (1995) **Immobilizing and imaging microtubules by atomic force microscopy.** *Ultramicroscopy*, 57 (4), 337-343.
- Virnik K., Lyubchenko Y., Karymov M., Dahlgren P., Tolstorukov M., Semsey S., Zhurkin V., Adhya S. (2003) **"Antiparallel" DNA Loop in Gal Repressosome Visualized by Atomic Force Microscopy.** *J. Mol. Biol.* 334, 53-63.
- Watson J.D. y Crick F.H.C. (1953) **Molecular structure of Nucleic Acids.** *Nature* 171, 737-738.
- Willemssen O.H., Snel M.M., Cambi A., Greve J., De Grooth B.J., Figdor C.G. (2000) **Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy.** *Biophys J.* 79 (6), 3267-3281. *Review.*
- ** Wong OK, Guthold M, Erie DA, Gelles J. (2008) **Interconvertible lac repressor-DNA loops revealed by single-molecule experiments.** *PLoS Biol.* 30 6 (9) e232.
- ** Yang Y., Sass L., Du C., Hsieh P., Erie D. (2005) **Determination of protein-DNA binding constants and specificities from statistical analyses of single molecules: MutS-DNA interactions** *NAR* 33 (13) 4322-4334.
- ** Yokokawa M., Wada C., Ando T., Sakai N., Yagi A., Yoshimura S., Takeyasu K. (2006) **Fast-scanning atomic force microscopy reveals the ATP/ADP-dependent conformational changes of GroEL.** *EMBO Journal*, 1-10.
- Yokota H, Nickerson DA, Trask BJ, van den Engh G, Hirst M, Sadowski I, Aebersold R. (1998) **Mapping a protein-binding site on straightened DNA by atomic force microscopy.** *Anal Biochem.* Nov 15;264(2):158-64.
- Zhang R.G., Kim Y., Skarina T., Beasley S., Laskowski R., Arrowsmith C., Edwards A., Joachimiak A., Savchenko A. (2002) **Crystal structure of Thermotoga maritima 0065, a member of the IclR transcriptional factor family.** *J Biol Chem.* 277 (21), 19183-90.

VII. Bibliografía

Zhang J., Zeuner Y., Kleefeld A., Unden G., Janshoff A. (2004) **Multiple site-specific binding of Fis protein to Escherichia coli nuoA-N promoter DNA and its impact on DNA topology visualised by means of scanning force microscopy.** *ChemBioChem*, 5, 1286-1289.

Zhang Y., McEwen A., Crothers D., Levene S. (2006) **Analysis of In-Vivo LacR-mediated Gene Repression Based on the Mechanics of DNA Looping.** *PlosOne* 1, e136.

Zylstra G. J., McCombie W. R., Gibson D. T., Finette B. A. (1988) **Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the tod operon.** *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1498-1503.

Zurla Ch., Samuely T., Bertoni G., Valle F., Dietler G., Finzi L., Dunlap D. (2007) **Integration host factor alters LacI-induced DNA looping.** *Biophysical Chemistry*, 128, 245-252.

VIII. ANEXOS

VIII.1 Abreviaturas, siglas y anglicismos

ADN	ácido desoxirribonucleico / DNA: (del inglés, siglas: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ADNasa I	enzima desoxirribonucleasa (<i>DNase I</i> en inglés)
AFM	Microscopía (o microscopio) de Fuerzas Atómicas (<i>Atomic Force Microscope / Microscopy</i>)
AMP-PNP	5'-adenililimidodifosfato (análogo no hidrolizable del ATP)
ARN	ácido ribonucleico
ARNp	ARN-polimerasa / RNAP: (del inglés, siglas: <i>deoxyribonucleic acid polymerase</i>)
ATP	adenosina- 5'-trifosfato
BzCoA	Benzoil Coenzima A
CcpA	carbon catabolite protein A
CCT	chaperonina de organismos eucariotas (del inglés, siglas: <i>Cytoplasmatic Chaperonin containing TCP-1</i>)
α-CTD	extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la RNAP (del inglés, siglas: <i>C-terminal domain</i>)
Da	unidad Dalton (gramos / mol)
DMS	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EMSA	Ensayo del cambio en la movilidad electroforética (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
FCCS	Espectroscopía de correlación de fluorescencia de dos colores (del inglés, siglas: <i>Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy</i>)
Fis	factor estimulador de la inversión (del inglés, siglas: <i>factor for inversion stimulation</i>)
FRET	transferencia resonante de energía de fluorescencia (<i>fluorescent resonance energy transfer</i>)
GA	glutaraldehído
GTP	guanidintrifosfato (de las siglas: <i>guanidine triphosphate</i>)
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazona-n-2-Etanosulfónico (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)

H-NS	proteína nucleoidea tipo histona de estructuración (del inglés, siglas: <i>histone-like nucleoid structuring protein</i>)
Hu	proteína nucleoidea inestable por calor (del inglés, siglas: <i>heat-unstable</i>)
HTH	dominio hélice-giro-hélice (del inglés: <i>Helix-turn-helix</i>)
IHF	factor de integración del hospedador (del inglés, siglas: <i>integration host factor</i>)
ITC	Calorimetría de valoración isotérmica (<i>Isothermal titration calorimetry</i>)
kb	kilobases
mdr	resistencia múltiple a fármacos (del inglés, siglas: <i>multi drug resistance</i>)
ME	Microscopía Electrónica
NTD	dominio amino terminal (del inglés, siglas: <i>N-terminal domain</i>)
NTPs	nucleótidos trifosfato: ATP, GTP, UTP, CTP.
NtrB/NtrC	proteínas B y C reguladoras de nitrógeno (del inglés, siglas: <i>nitrogen regulatory proteins</i>)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés, siglas: <i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
pb	par(es) de bases (bp en inglés, <i>base pairs</i> , y por ello : « kbp »)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, siglas: <i>polymerase chain reaction</i>)
pdb	<i>Protein data bank</i> (y archivo del PDB con las coordenadas cristalográficas de la estructura resuelta).
RNA	ácido ribonucleico (del inglés, siglas: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAP	RNA polimerasa (del inglés, siglas: <i>ribonucleic acid polymerase</i>)
TIRFM	Microscopía de fluorescencia por reflexión interna total (<i>total internal reflection fluorescent microscopy</i>)
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1, 3-propanodiol, o tris(hidroximetil)aminometano.
UCA	Ultracentrifugación Analítica

Anglicismos

<i>bulk</i>	en grandes cantidades/en gran volumen. Se habla de trabajo “en <i>bulk</i> ” en contraposición al trabajo a nivel de “moléculas individuales”. Se podría traducir como “en solución”.
<i>cluster</i>	conjunto, racimo o agrupación (de proteínas en este caso).
<i>footprint</i>	huella (ensayos de <i>footprinting</i>)
<i>hairpin</i>	estructura de tipo horquilla
<i>loop</i>	estructura de tipo lazo o bucle
<i>review</i>	revisión (publicación)

Abreviaturas latinas

<i>i.e.</i>	id est
<i>et al.</i>	et alii

VIII.2. Participación en congresos, estancias breves

Participación en congresos

- EMBO/FEBS Workshop on AFM Applications in Biology. Oeiras, Portugal. 7-9 Julio 2004. (Oyente).
- Workshop on advanced dynamic AFM methods. Instituto de Microelectrónica de Madrid (CSIC) 8-10 octubre 2004. (Oyente).
- Reunión Nacional sobre "Estabilidad y plegamiento de proteínas". Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) Madrid, 10-11 de marzo 2005. (oyente)
- XXII Reunión bienal de la S.M.E. Granada, 28 de Junio al 1 de Julio 2005. (Presentación del póster "Caracterización estructural y funcional de una chaperonina de tipo II mediante Microscopía de Fuerzas Atómicas", Paloma Gutiérrez del Arroyo, Marisela Vélez, José L. Carrascosa, José María Valpuesta). "Premio a la mejor comunicación en panel en el área de Biología y Biomedicina".
- One-day Force Microscopy Meeting. Universidad Autónoma de Madrid. 6 de Julio 2005. (Oyente).
- Simposio internacional sobre "Nanomecánica de proteínas". Fundación Ramón Areces. Madrid 18-19 de Octubre 2005. (Oyente).
- Frontiers in Chemical Biology: Single Molecules. Cambridge, Reino Unido, 26-29 Marzo 2006. (Oyente).
- XII Escuela de verano del Instituto Nicolás Cabrera sobre "Biofísica", Miraflores, 18-22 septiembre 2006. (estudiante. Presentación del póster: "Structural & functional characterization of a type II chaperonin by Atomic Force Microscopy" Paloma Gutiérrez del Arroyo, Marisela Vélez, José L. Carrascosa, José María Valpuesta).
- VI Ibero-American Congress of Biophysics. Madrid. 24-27 septiembre 2006. (Intervención oral: "Characterization of transcription regulatory complexes of bacteriophage Phi29 by Atomic Force Microscopy" Paloma Gutiérrez del Arroyo, Marisela Vélez, Margarita Salas, José L. Carrascosa, Ana Camacho).
- AFM-BioMed Conference. Barcelona. 18-21 Abril 2007. (Intervención oral: "Characterization of transcription regulatory complexes of bacteriophage Phi29 by Atomic Force Microscopy" Paloma Gutiérrez del Arroyo, Marisela Vélez, Margarita Salas, José L. Carrascosa, Ana Camacho).
- "Nanotechnology of biological membranes", Universidad Complutense de Madrid. 24 de abril 2007. (Oyente).

- XXIII Reunión bienal de la S.M.E. Bilbao. 3-6 julio 2007. (Intervención oral: "Caracterización estructural de complejos DNA-proteína de regulación de la transcripción mediante microscopía de fuerzas atómicas" Paloma Gutiérrez del Arroyo, Marisela Vélez, Margarita Salas, José L. Carrascosa, Ana Camacho).

Presentación de mi trabajo por colaboradores:

- FASEB. "Mechanism and Regulation of Prokaryotic Transcription". Saxton's River, Vermont. EEUU (2007). Comunicación de póster: **Ana Camacho**, Paloma Gutiérrez del Arroyo, Laura Pérez-Lago, Marisela Vélez, José L. Carrascosa, Margarita Salas (2007). Sequence requirements and conformational modification of the DNA required for the transcriptional switch of phage Ø29.
- FASEB. "Helicases & NTP-Driven Nucleic Acid Motors: Structure, Function, Mechanisms & Roles in Human Disease" Indian Wells, California, EEUU (2007). Comunicación de póster: Origin meeting and unwinding by SV40 T antigen-new insights from 3D-EM. **Isabel Cuesta**, Rafael Núñez-Ramírez, Paloma G. del Arroyo, Schors H.W. Scheres, X.S. Chen, E. Fanning, José María Carazo.
- Comunicación de póster: "Hacia un mejor entendimiento por EM y AFM de los mecanismos moleculares de la actividad de la helicasa LTag del virus SV40" **I. Cuesta**, R. Núñez-Ramírez, P. Gutiérrez del Arroyo, S.H.W.Scheres, X.S. Chen, E. Fanning, J.M. Carazo.

Estancias breves

Durante esta tesis realicé una estancia breve de tres meses de duración supervisada por el Dr. Olivier Piétrement, en el laboratorio de Microscopies Moléculaire et Cellulaire (LM2C) del departamento "Interactions Moléculaires et Cancer" (UMR CNRS 8126) del Institut de cancérologie Gustave Roussy (París), dirigido por Eric Le Cam.

VIII.3. Publicaciones

María-Eugenia Guazzaroni; Tino Krell; Paloma Gutiérrez del Arroyo; Marisela Vélez; Mercedes Jiménez; Germán Rivas; Juan Luis Ramos (2007) **The transcriptional repressor TtgV recognizes a complex operator as a tetramer and induces convex DNA bending.** *J. Mol. Biol.* 369 (4) 927-39.

Lacal J, Guazzaroni ME, Gutiérrez del Arroyo P, Busch A, Vélez M, Krell T, Ramos JL. (2008) **Two Levels of Cooperativeness in the Binding of TodT to the tod Operon Promoter.** *J. Mol. Biol.* 384 (5) 1037-47.

Paloma Gutiérrez del Arroyo; Marisela Vélez; Olivier Piétrement; Margarita Salas; José L. Carrascosa; Ana Camacho. **A nucleoprotein-hairpin in transcription regulation.** *Journal of Structural Biology.* Publicado on line, julio 2009 (DOI: 10.1016).

Un cuarto artículo (Durante-Rodríguez *et al.*) concerniente al sistema de regulación de BzdR de *Azoarcus sp.* CIB se encuentra en preparación.

